

THÈSES

présentées

à la FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir le grade de Docteur ès sciences naturelles

par

J. GARNIER

Première Thèse : *Contribution à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la cyanamide et essais sur l'action biologique de la cyano-guanidine (dimère de la cyanamide).*

Deuxième Thèse : *Les Trichomycètes.*

Soutenues le 19 décembre 1959 devant la commission d'examen :

MM. R. ECHEVIN Président.

P. REMY

A. VEILLET

} Examinateurs

THÈSES

présentées

à la FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir le grade de Docteur ès sciences naturelles

par

J. GARNIER

Première Thèse : *Contribution à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la cyanamide et essais sur l'action biologique de la cyano-guanidine (dimère de la cyanamide).*

Deuxième Thèse : *Les Trichomycètes.*

Soutenues le décembre 1959 devant la commission d'examen :

MM. R. ECHEVIN	Président.
P. REMY	Examineurs
A. VEILLET	



UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen : M. URION

Assesseur : M. ECHEVIN

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE

Professeurs honoraires : MM. DARMOIS, GUTTON, CROZE, RAYBAUD, FALLOT, LAFFITTE, LERAY, DONZELOT, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, OLMER, DÔDE, GAUTHIER.

Maîtres de conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

PROFESSEURS

MM.
CHEVALLIER Physique
URION Chimie biologique
DELSARTE .. Analyse supérieure
REMY Zoologie
ROUBAULT .. Géologie
GUERIN ... Chimie industrielle
VEILLET ... Biologie animale
ECHEVIN .. Botanique
WAHL Chimie organique industrielle
BARRIOL ... Chimie théorique
BIZETTE ... Physique
GUILLIEN ... Electronique

MM.
GIBERT Chimie. Physique et Electrochimie
HERVÉ Calcul diff. et intégral
LEGRAS Mécanique rationnelle
DAVID Chimie biologique
BOLFA Minéralogie
NICLAUSE .. Chimie
FAIVRE ... Physique appliquée
AUBRY Chimie générale
COMOLET .. Mécanique physique
DUVAL Génie chimique
COPPENS ... Radiogéologie
LIONS Méth. Math. de la physique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.
WERNER ... Botanique
FRUHLING .. Radiotechnique
GAYET Physiologie
MANGENOT .. Phytopathologie
GARNIER ... Agronomie
BRUHAT Mathématiques générales
SADRAN ... Géochimie
CHAPON ... Chimie biologique
HADNI Physique
Mme ROIZEN Physique
SUHNER Physique
HILLY Géologie de la Lorraine

MM.
MALAPRADE Chimie
REGNIER ... Physico-chimie
LE GOFF Génie chimique
KERN Minéralogie
WEPPE Minéralogie appliquée
LERMUSIAUX Physique de l'état métall.
BERNARD ... Géologie
ARAGNOL .. Mathématiques (propédeut.)
BONVALET .. Mécanique appliquée
CONDÉ Zoologie
RENARD ... Physique théorique et nucléaire
BASTICK Chimie

Secrétaire : M. LAPOINTE.

CONTRIBUTION

**A L'ÉTUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CYANAMIDE
ET ESSAIS SUR L'ACTION BIOLOGIQUE DE LA CYANOGUANIDINE
(DIMÈRE DE LA CYANAMIDE)**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PLAN DU MEMOIRE

- I. HISTORIQUE.
- II. SUBSTRAT : PREPARATION, PROPRIETES.
- III. RECHERCHE DE LA CYANAMIDASE CHEZ DIVERS GROU-
PES DE VEGETAUX.
- IV. CARACTERES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA
CYANAMIDE PAR *ASPERGILLUS NIGER* VAN TIEGH. ET
FACTEURS CONDITIONNANT L'ACTIVITE DE L'ENZYME.
- V. PROPRIETES CYANAMIDASQUES DE QUELQUES CHAM-
PIGNONS INFERIEURS.
- VI. ACTION DE LA CYANOGUANIDINE (DIMERE DE LA CYA-
NAMIDE) SUR QUELQUES CHAMPIGNONS.
- VII. CONCLUSIONS GENERALES.
- VIII. BIBLIOGRAPHIE.

CHAPITRE I

Historique

Historique

La fabrication de la cyanamide calcique (*) premier engrais azoté de synthèse, trouve son origine dans les recherches, effectuées au milieu du dix-neuvième siècle, en vue d'obtenir des cyanures par action de l'azote sur les oxydes alcalins ou alcalino-terreux, sur le carbone et sur les carbures. En 1894, MOISSAN tente de fixer l'azote sur du carbure de calcium pur. En 1895, WILSON réussit cette fixation mais sa découverte semble ne pas avoir retenu l'attention. Ces recherches sont reprises par Albert FRANK et à la fin de l'année 1895 paraît le premier brevet FRANK et CARO.

Contrairement au carbure de baryum, le carbure de calcium sous l'action de l'azote ne donne pas de cyanures mais seulement de la cyanamide calcique. Cette cyanamide ainsi préparée, traitée par un fondant approprié, donne des cyanures et ce fut là, tout d'abord, son unique emploi. L'idée d'employer la cyanamide comme engrais est exprimée pour la première fois en 1901 dans les brevets allemands 152.260 et 154.505 accordés à la « Cyanid Gesellschaft » créée par FRANK à Berlin (in 69). A cette époque, la crise de l'industrie des cyanures, causée par la guerre au Transvaal qui empêchait le fonctionnement des mines aurifères, contribue à donner une nouvelle direction à l'industrie de la cyanamide (in 46). En 1903, GERLACH et WAGNER (39) publient les premiers résultats obtenus au cours d'expériences culturales effectuées au laboratoire et sur le terrain : ils montrent que, mélangée à la terre arable, la cyanamide calcique produit des effets équivalents ou légèrement inférieurs à ceux du sulfate d'ammoniaque ou du nitrate de soude, employés comparativement.

* Nous utilisons ici la terminologie proposée par A. GUILLAUMIN (48) en appelant cyanamidé de calcium le composé défini CN_2CA et cyanamide calcique le produit industriel utilisé comme engrais souvent appelé cyanamide ou cianamide tout court et renfermant de 57 à 71 % de CN_2CA .

D'après C. GRANIER (46) ces résultats, confirmés par ZIELLSTROFF, OTTO, ERLEWEIN, etc.... décident les industriels italiens, poussés par le Professeur MENOZZI, à créer la « Société générale de la cyanamide » dont le siège est à Rome. L'Italie voit fonctionner en 1906 la première installation de Torre Passin ; les autres pays d'Europe suivent deux ou trois ans plus tard.

A la suite des essais de GERLACH et WAGNER, de très nombreuses études sur la valeur fertilisante de la cyanamide et sur sa décomposition dans le sol sont publiées. Dès le début des recherches, il est admis, et c'est l'opinion de la plupart des auteurs actuels, que la cyanamide ne peut, telle qu'elle, servir de source d'azote aux végétaux supérieurs, qu'elle doit être transformée dans le sol en un produit utilisable par le végétal.

En 1905 IMMENDORF et THIELEBEN (52) estiment que la transformation de la cyanamide s'effectue par un *processus chimique* répondant à la réaction :



La même année BEHRENS (7), d'une part, et LÖHNIS (66) d'autre part, pensent que cette transformation est le résultat d'un *processus biologique* et que des composés ammoniacaux naissent de l'action de microorganismes.

En 1095 et 1906 ASHBY (2) adopte ce point de vue. Mais de 1906 à 1910 ULPANI (104) (105) (106) (107) admet une transformation rapide en urée par voie physico-chimique et indique que les microorganismes ne semblent jouer aucun rôle. ULPANI parle également d'une autre transformation possible de la cyanamide dans le sol, transformation lente, une polymérisation en son dimère la dicyano-diamide. En 1909 et 1910, LÖHNIS (67) (68) confirme la transformation en urée ; KAPPEN, à la même époque (54) (55) (57) (59), confirme à son tour cette transformation en urée par voie physico-chimique. STUTZER (100), STUTZER et REIS (101) arrivent aux mêmes conclusions qu'ULPANI et KAPPEN mais n'excluent pas totalement l'intervention des microorganismes dans le premier stade de la transformation de la cyanamide, c'est-à-dire la formation d'urée.

Nous avons seulement cité, ci-dessus, les travaux qui marquent les étapes essentielles. Nous reviendrons, le cas échéant, sur ces travaux et sur certains de ceux qui relatent des essais culturaux et des études d'ordre chimique, dans les paragraphes ultérieurs. De ces travaux, qui nous ont paru primordiaux, deux faits importants, quant à notre étude, semblent se dégager :

1) Vers 1913 la grande majorité des chercheurs admettent que, dans le sol, la cyanamide est transformée en ammoniacque avec les stades suivants :

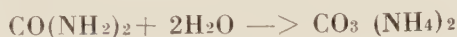
a) La cyanamide de calcium CN_2Ca est hydrolysée en cyanamide libre CN_2H_2 et en hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$.



b) La cyanamide est ensuite hydrolysée en urée



c) L'urée est finalement convertie en carbonate d'ammonium



2) Dès le début des recherches deux théories s'affrontent : la théorie de la transformation par voie physico-chimique défendue par IMMENDORF, ULPANI, KAPPEN et celle qui fait intervenir un processus biologique, soutenue par BEHRENS, ASHBY, LÖHNIS. Des controverses s'engagent d'ailleurs entre ULPANI et LÖHNIS.

En 1919, MAZÉ, VILA et LEMOIGNE (71) (72) montrent que certains microorganismes du sol peuvent réaliser la transformation de la cyanamide en urée. SCHMALFUSS (96) (97) confirme en 1937 et 1938 l'opinion précédente et montre que, dans certaines conditions, *Aspergillus niger* van Tiegh. est un bon agent de transformation de la cyanamide en urée. Cet auteur arrive à la conclusion que les microorganismes du sol (Bactéries et Champignons) jouent un rôle essentiel dans la transformation de la cyanamide en urée ; il pense même que les transformations par voie physico-chimique sont de faible importance. Le mécanisme du processus reste inconnu. De 1935 à 1953 ROTINI (91) (92) (93), au contraire, se rallie à la théorie physico-chimique d'ULPANI, opinion qui avait été antérieurement acceptée par COWIE (24) (25), par KAPPEN (60) et par DANSI (27). MAKKUS (69) dans une intéressante étude de synthèse sur la cyanamide de chaux, se range aux idées de KAPPEN et signale que la « formation d'urée par la cyanamide de chaux doit être considérée comme un phénomène physico-chimique ». Les auteurs précédents font intervenir dans cette transformation le « pouvoir absorbant du sol » (KAPPEN), les « colloïdes » (DANSI), les « combinaisons de manganèse et de fer » (KAPPEN).

L'hydrate de fer est reconnu par STUTZER comme un excellent catalyseur ; cet auteur démontre que l'adjonction de minéral de fer accélère la transformation de la cyanamide calcique.

Dans son travail sur « L'acidité du sol » KAPPEN (60) soutient le point de vue que la formation de l'urée est « tout à fait indépendante des microorganismes » et que les produits colloïdaux du sol interviennent dans l'hydrolyse de la cyanamide en urée. En 1934 PRATOLONCO, JOB et ROTINI (86) montrent la possibilité de l'action de l'hydrate de magnésium dans la réaction.

Mais en 1946 TEMME (102), en s'inspirant de certains essais de SCHMALFUSS, montre bien la possibilité de l'utilisation par les microorganismes (*Aspergillus niger* et Bactéries diverses) de l'azote de la cyanamide. Il constate, d'autre part, que le mycélium broyé d'*Aspergillus niger* peut transformer la cyanamide en urée, sans préciser le mécanisme. Il signale, fait plus curieux, que le filtrat de mycélium broyé dans l'eau distillée ne peut hydrolyser l'urée, ce qui lui fait conclure que « l'agent » qui cause l'hydrolyse de la cyanamide et l'enzyme qui hydrolyse l'urée ne sont pas les mêmes.

Néanmoins, ces essais effectués en sol stérilisé à l'autoclave lui font admettre que les transformations physico-chimiques dans le sol sont beaucoup plus rapides et plus intenses que celles qui peuvent découler d'un processus biologique. Avec KUHN et DRECHSEL (62) et A. et G. WOLFF (112) il insiste sur l'action sélective de la cyanamide calcique sur la microflore du sol, la diminution du nombre des microorganismes du sol après apport de cet engrais (« cyanamide shock »). Bien que ne faisant intervenir aucun mécanisme, il signale que cette diminution du nombre des microorganismes sera bientôt suivie par une intense prolifération, mais que la cyanamide aura disparu quand la microflore sera « adaptée » elle-même. En 1952 DEMOLON (28) dans la dernière édition de sa « Dynamique du sol », se range au point de vue de TEMME et dit « cette hydrolyse est d'origine physico-chimique, elle dépend de la température et de l'humidité ». En 1954, HOFMANN, AMBERGER, SUSS (49) obtiennent, dans un sol momentanément privé de ses microorganismes par le toluol, une décomposition de la cyanamide ; ils remarquent en même temps la formation de dicyanamide (dimère de la cyanamide).

En 1951 Y. LAMAIRE et A. BRUNEL (64) montrent que l'*Aspergillus niger* peut, dans certaines conditions de culture, utiliser l'azote de la cyanamide ; ils précisent le mécanisme de cette utilisation, le Champignon produisant en présence du substrat spécifique un enzyme d'adaptation : la cyanamidase qui hydrolyse la cyanamide en urée, l'uréease achevant l'hydrolyse jusqu'au stade ammoniacal. C'est sur proposition de A. BRUNEL que nous avons été amenés à reprendre cette question de la dégradation enzymatique de la cyanamide par certains Champignons du sol. Entre temps LATZKO et AMBERGER (63) montrent la toxicité de la cyanamide chez les végétaux supérieurs. HOFMANN et LATZKO (51) étudient par radioautographie

à l'aide de cyanamide de baryum marquée ^{14}C N_2Ba l'absorption et la répartition de cette amide dans le végétal. HOFMANN, LATZKO, SUSS (50) à l'aide de cyanamide marquée ^{14}C et s'appuyant sur la découverte de LAMAIRE et BRUNEL arrivent à la conclusion qu'un enzyme existe chez les végétaux supérieurs cultivés sur milieux contenant de la cyanamide et est capable de l'hydrolyser. Ils se basent sur le fait que de tels végétaux éliminent par respiration du $^{14}\text{CO}_2$. Nous reviendrons ultérieurement sur certaines conclusions de ce travail, n'ayant pu, dans nos conditions expérimentales, arriver aux mêmes résultats. La question de la transformation de la cyanamide reste néanmoins délicate, les processus parfois difficiles à interpréter: DEMOLON (29) admet que les irrégularités constatées dans l'emploi de cet engrais « relèvent probablement des transformations subies dans le sol et des réactions secondaires qui nous sont encore mal connues ». En 1955 CHANCRIN et GUÉRILLOT (21) reprenant les idées de DEMOLON concluent : « Il est probable que les transformations subies dans le sol sont variables. Elles sont encore mal connues malgré un nombre considérable de travaux ».

C'est volontairement que dans le rapide résumé de l'évolution des travaux sur le mécanisme de dégradation de la cyanamide, nous avons négligé les très nombreuses publications agronomiques (italiennes, allemandes, japonaises, anglaises et françaises surtout). Elles tendent pour la plupart, soit à comparer l'action de la cyanamide à celle des autres engrais azotés quant aux rendements des différents végétaux cultivés, soit à préciser les meilleures techniques d'emploi de cet engrais (doses, dates et modalités d'application, suivant les cultures). Néanmoins la consultation de ces documents montre que depuis le début de l'emploi de la cyanamide les auteurs sont frappés par l'irrégularité des résultats obtenus : des phénomènes de toxicité sont rapportés à la cyanamide elle-même, à la chaux vive, aux diverses imputetés, à l'acétylène dégagée ou très fréquemment même par des auteurs récents (65) (90) à la « dicyanamide ». Cette opinion nous a amené à reprendre l'étude de l'action du dimère de la cyanamide sur la croissance de certains Champignons inférieurs.

CHAPITRE II

Substrat

PREPARATION — PROPRIETES

- I. CHOIX DU PRODUIT DE DEPART.
- II. PREPARATION DE LA CYANAMIDE ARGENTIQUE.
- III. VERIFICATION DE LA PURETE DU PRODUIT OBTENU.
- IV. PRECAUTIONS NECESSITEES PAR LES PROPRIETES DE LA CYANAMIDE LIBRE.

Substrat

PREPARATION — PROPRIETES

I. — CHOIX DU PRODUIT DE DEPART.

La cyanamide calcique industrielle renferme toujours de très nombreuses impuretés ; les divers travaux portant sur l'analyse de l'engrais signalent à côté de la cyanamide de calcium la présence de : carbures, cyanures, cyanoguanidine, guanilylée, thio-urée, thio-cyanates, éléments métalliques variés. Ces corps peuvent, à des titres divers (source complémentaire d'azote, toxique, inhibiteur ou activateur d'enzyme, etc...), modifier de façon très importante la réaction de l'organisme végétal à l'action de la cyanamide de calcium. Cette simple considération rend souvent difficile l'interprétation des résultats d'essais obtenus avec l'engrais.

Par ailleurs, la préparation de cyanamide de calcium pure (CN_2Ca) qui nécessite des températures de 700 à 900° sous vide ou dans un courant d'ammoniac ou d'azote reste difficile et l'obtention d'un produit pur est délicate (48).

De plus, la cyanamide de calcium, sel d'un acide très faible : la cyanamide vraie CN_2H_2 et d'une base relativement forte : la chaux, présente en solution aqueuse une réaction très fortement alcaline. Son adjonction à des milieux de culture ou à des préparations enzymatiques n'est pas sans entraîner des perturbations du pH initial, difficiles à atténuer sans fortes doses de tampons à capacité élevée.

La préparation des cyanamides mono ou disodique et bipotassique pures, qu'il serait possible d'utiliser dans l'étude de l'action biologique de l'azote cyanamidique, présente de sérieuses difficultés.

Ces considérations nous ont amené à utiliser, tant pour les cultures que pour la détection de la cyanamidase ou l'étude de l'hydrolyse enzymatique, des solutions de cyanamide libre CN_2H_2 préparées au moment de l'emploi par décomposition quantitative de la cyanamide d'argent par l'acide chlorhydrique. Ce qui nous a conduit à

préparer à partir de la cyanamide calcique du commerce, seule source disponible de cette amide, une cyanamide d'argent aussi pure que possible.

II. - PREPARATION DE LA CYANAMIDE ARGENTIQUE.

La cyanamide d'argent CN_2Ag_2 se présente sous forme d'un précipité jaune obtenu en traitant une solution de cyanamide libre par le nitrate d'argent ammoniacal. L'obtention d'une cyanamide argentique pure avec un rendement convenable nécessite certaines précautions. L'hydrolyse, qui peut être extrêmement brutale, ou la polymérisation de la cyanamide libre sont toujours à redouter ainsi que la précipitation d'impuretés plus ou moins difficiles à séparer de la cyanamide d'argent. A. CHRÉTIEN et B. WORINGER (22) ayant préparé de la cyanamide argentique en vue d'étudier sa pyrolyse ont fait remarquer que le pH et la température étaient les facteurs dominants des perturbations possibles. Ils opéraient à 0° et acidifiaient la solution de cyanamide de calcium jusqu'à pH = 6 à l'aide d'acide nitrique.

En nous inspirant de ces données nous avons pu, après différents essais, mettre au point une technique simple de préparation en opérant sur des solutions aqueuses relativement peu concentrées et sans tenir compte de la température. La pureté du produit obtenu a toujours été préférée au rendement.

50 g. de cyanamide calcique du commerce sont délayés dans 500 ml. d'eau distillée : une agitation à la main d'environ deux minutes est suffisante. On filtre sur papier pour éliminer toutes les parties solides. Le filtrat est immédiatement amené à un pH compris entre 6 et 6,5 avec de l'acide nitrique pur dilué au 1/5°. On ajoute lentement et en agitant du nitrate d'argent ammoniacal. Les sulfures et acétylures noirs précipitent les premiers, une filtration sur papier épais permet d'en éliminer la majeure partie. Dans le filtrat, une nouvelle adjonction de nitrate d'argent ammoniacal entraîne la précipitation de la cyanamide d'argent. On laisse déposer quelques minutes et on décante pour éliminer environ la moitié du volume du liquide surnageant. Le précipité remis en suspension dans le reste du liquide est dissous dans l'acide nitrique dilué au 1/5°, une filtration élimine les principales impuretés non dissoutes (sulfures en particulier). La cyanamide d'argent est immédiatement précipitée par l'ammoniaque diluée au 1/5°. Ce précipité est purifié par redissolutions, filtrations et précipitations successives. Le dernier précipité filtré est rincé plusieurs fois à l'eau distillée et mis à sécher en couche mince à l'étuve à 105°. La cyanamide d'argent d'un jaune franc, ainsi préparée, est conservée au sec et à l'obscurité pour éviter son brunissement et la mise en liberté d'ammoniac.

III. VERIFICATION DE LA PURETE DU PRODUIT OBTENU. ANALYSE.

La pureté de la cyanamide d'argent ainsi obtenue est vérifiée après chaque préparation. Après essais comparés, deux méthodes, équivalentes quant aux résultats, nous paraissent possibles ; nous avons utilisé la seconde.

- 1) Détermination de la teneur en azote total d'un échantillon par la méthode de Kjeldahl.
- 2) Transformation à 50° par l'acide nitrique N de la cyanamide d'argent en urée, précipitation de l'urée par le xanthidrol et pesée du précipité de dixanthylurée selon la méthode de dosage pondéral de la cyanamide mise au point par FOSSE, HAGÈNE et DUBOIS (35) (36) (37).

IV. PRECAUTIONS NECESSITEES PAR LES PROPRIETES DE LA CYANAMIDE LIBRE.

L'accord n'est pas fait sur la constitution de la cyanamide libre ; c'est un composé amphotère qui donne des sels avec les acides et avec les bases. Deux formules ont été proposées (48) (23) et permettent de traduire ce caractère amphotérique :

- 1) La forme basique ou cyanamide proprement dite correspondrait à un nitrile carbamique $N \equiv C - NH_2$.
- 2) La forme acide à une diimine carbonique (méthane diimine) $HN = C = NH$. Cette forme est, d'après certains auteurs, inconnue à l'état libre mais on en connaît les dérivés substitués : principalement le dérivé diphénylé (Diphényl-carbo-diimine ou carbodiane).

Il s'agirait donc d'un cas de tautomérie



et cette isomérisie reversible permettrait d'expliquer les propriétés de ce corps. COCHET (23) émet l'hypothèse que dans les conditions où la cyanamide est employée elle peut réagir sous la forme $HN = C = NH$ « qui ne contient pas le groupe toxique $-C \equiv N$ ». Des travaux plus récents de BARSKY (5) et de PLOQUIN, VERGNEAU et SOUVRAY (84) basés respectivement sur l'examen des propriétés optiques ou l'étude magnétochimique de corps, ont amené leurs auteurs à pencher pour la formule $N \equiv C - NH_2$.

Quoi qu'il en soit *la cyanamide libre est extrêmement labile*, et suivant la nature du milieu elle se transforme toujours avec facilité, dans des directions différentes. L'étude qualitative, au moins partielle, a été faite depuis longtemps par ULPANI qui avait montré que suivant les conditions d'acidité ou d'alcalinité de la solution, la cyanamide se transformait en urée, cyanoguanidine, mélamine, acide cyanurique ou dérivés divers de cet acide. BARSKY dans une étude de synthèse (6) cite en particulier les travaux de GRUBE, MORREL et leurs collaborateurs en 1913-1914 et ceux de HETHERINGTON, BUCHANAU et BARSKY en 1934. COCHET en 1927 avait étudié (23) l'évolution des solutions de cyanamide libre en fonction du pH en vue de déterminer les conditions de formation de la dicyanodiamide.

D'après ces travaux et nos propres observations au moment de la mise au point des techniques d'essai, on peut ainsi résumer le phénomène :

1) En milieu neutre et à basse température les solutions sont relativement stables.

Une solution fraîche tamponnée à pH 7 peut être conservée à la glacière 48 heures sans que l'on constate de formation d'urée (pas de précipité de dixanthylurée en milieu acétique) ou de cyanoguanidine (précipité blanc floconneux en présence de KOH ou NH_4OH , précipité insoluble dans l'acide nitrique).

Il est très important d'insister sur la *fragilité de la cyanamide libre* : en solution aqueuse à pH = 7 et à 38° l'urée est déjà décelable deux heures après la mise en solution.

2) En milieu acide il se forme de l'urée : la réaction est extrêmement rapide ; la présence de l'urée peut être décelée à la température du laboratoire quatre heures après la préparation de la solution. Au delà de pH 5,5 la présence de l'urée n'est décelable qu'après 18 ou 20 heures (température du laboratoire). Dans ces conditions il peut se former en plus de l'urée de la mélamine et de l'acide cyanurique (23).

L'apparition très rapide d'urée peut être constatée dans une solution de cyanamide libre pure, sans adjonction d'aucun électrolyte ou catalyseur quelconque.

L'augmentation de la température accélère la réaction ; ce qui interdit absolument toute stérilisation à l'autoclave d'une solution de cyanamide, opération qui entraîne, en plus de l'urée, l'apparition de guanlylurée.

3) En milieu basique, on constate surtout une polymérisation en cyanoguanidine, avec optimum entre pH 9,3 et 9,9. Cette polymérisation, très nette à la température du laboratoire, est pratiquement totale à 100°.

Certains travaux sur la cyanamide nous paraissent sans valeur du fait de l'absence de précautions ou de témoins indispensables, des transformations spontanées ayant pu être considérées comme des actions biologiques. Les contradictions relevées dans les données bibliographiques ont probablement pour cause l'instabilité de ce corps, son évolution possible vers des voies différentes et l'action que peuvent avoir sur les organismes les impuretés contenues dans la cyanamide industrielle. Ces contradictions, ainsi qu'une connaissance encore très imparfaite, de la constitution de la cyanamide libre et de son comportement, la très grande labilité de ce corps, nous ont amené à multiplier les précautions pour éviter, au maximum, les erreurs d'interprétation.

Il paraît au moins indispensable :

- 1) de préparer les solutions au moment de l'emploi.
- 2) de ne jamais stériliser par la chaleur toute solution ou tout milieu contenant de la cyanamide.
- 3) d'étudier l'action de tout corps ou tout milieu ajouté à une solution de cyanamide, pour apprécier ou éliminer le cas échéant cette action.
- 4) de prévoir des témoins dans toute étude de l'action des organismes sur la cyanamide, pour apprécier la part de la transformation naturelle.

CHAPITRE III

Recherche de la cyanamidase chez divers groupes de végétaux

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ENZYME D'ADAPTATION CHEZ *ASPERGILLUS NIGER* VAN TIEGH.

- A — Obtention du matériel enzymatique.
- B — Protocole expérimental.
- C — Résultats.
- D — Conclusions.

II. RECHERCHE DE LA CYANAMIDASE CHEZ LES DIFFERENTS VEGETAUX.

- A — Champignons inférieurs.
 - a) *Provenance :*
 - Mycothèques.
 - Isolements.
 - b) *Culture avec différentes sources d'azote autres que la cyanamide.*
 - c) *Protocole expérimental.*
 - d) *Résultats et conclusions.*
- B — Phanérogames.
 - a) *Provenance et préparation des organes végétaux.*
 - b) *Protocole expérimental.*
 - c) *Résultats.*

III. CYANAMIDASE ET UREASE.

IV. CONCLUSIONS.

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ENZYME D'ADAPTATION CHEZ *ASPERGILLUS NIGER* VAN TIEGH.

$$\text{CN}_2\text{H}_2 \xrightarrow[\text{+ H}_2\text{O}]{\text{cyanamidase}} \text{O} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \xrightarrow[\text{+ H}_2\text{O}]{\text{ur\'ease}} \text{CO}_2 + \text{NH}_3$$

Nous avons dès le début de notre travail confirmé tous ces faits en procédant comme suit :

A. — Obtention du matériel enzymatique.

On prépare un milieu de Bertrand (18) sans azote, de concentration double de la normale soit :

Saccharose	45	g.
PO ₄ KH ₂	0,6	g.
CO ₃ K ₂	0,4	g.
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	0,85	g.
SO ₄ Fe 7 H ₂ O	0,86	g.
SO ₄ Zn 7 H ₂ O	0,041	g.
SO Mn H ₂ O	0,02	g.
Acide tartrique	2,65	g.
Eau q. s. p.	500	ml.

On stérilise à l'autoclave 20 minutes à 120°.

Au moment de la mise en culture, on prépare la cyanamide libre en attaquant 2,557 g. de CN₂Ag₂ par 20 ml. de HCL (N). Après agitation prolongée, en écrasant avec l'agitateur tous les fragments de cyanamide argentique jusqu'à disparition totale de teinte jeune, on filtre sur verre fritté G₃ et on porte le filtrat à 100 ml. avec de l'eau distillée stérile. 83,5 ml. de cette solution 0,1 M de cyanamide libre sont étendus à 500 ml. avec de l'eau distillée stérile et ajoutés à 500 ml. de milieu de Bertrand préparé comme indiqué ci-dessus. Ce milieu contient par litre le 1/5^e de la dose normale d'azote qui est de 1,17 g. par litre ; nous verrons dans le chapitre IV qu'une dose plus forte de cyanamide empêche la croissance du Champignon. Le milieu est mis en cuvette rectangulaire (30×18 cm.) en verre pyrex : onensemence massivement à l'aide de conidies d'*A. niger* provenant de cultures en tubes et mises en suspension dans quelques ml. d'eau distillée. On recouvre d'une plaque de verre en intercalant entre la plaque et les bords de la cuvette des tiges de verre de gros diamètre.

Après 36 heures de culture à 34° (au delà de 36 heures les conidies commencent à se colorer), on récolte le mycélium qui est lavé à l'eau courante, puis rincé trois fois à l'eau distillée en exprimant l'eau, entre chaque rinçage, à l'aide de feuilles de papier à filtrer. Ce mycélium, ainsi privé des composants du milieu de culture, est desséché sous vide en présence de chlorure de calcium. Après 24 heures le mycélium est broyé au moulin électrique et passé au tamis n° 80. On obtient ainsi une poudre (poudre A du tableau ci-dessous) qui provient d'un mycélium obtenu sur un milieu ne renfermant que de la cyanamide comme source d'azote.

Une macération constituée de 20 parties de tampon de Mac Ilvaine : Phosphate disodique — Acide citrique de pH 7 et d'une partie de poudre mycélienne (poudre A) est immédiatement préparée et conservée 24 h. à la glacière à + 4° ; après ce délai on obtient

en partant de cette macération, par centrifugation et filtration sur coton, un liquide d'extraction (liquide A du tableau ci-dessous) doué d'une nette activité cyanamidase.

Simultanément on met en culture la même souche d'*A. niger* sur milieu de Bertrand normal, la source d'azote étant constituée par 3 g. de NO_3NH_4 et 0.2 g. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ soit 1,17 g. d'azote par litre de solution nutritive : le mycélium recueilli est lavé, rincé, séché et broyé dans les mêmes conditions que précédemment (nous désignons ce broyat par poudre B).

B. — Protocole expérimental.

On place au bain-marie réglé à 38° des fioles coniques contenant les différents milieux T₁, T₂, E₁, E₂, E₃, correspondant aux compositions suivantes (T = témoin, E = essai) :

TABLEAU I

	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Tampon *	20 ml	20 ml	20 ml	12 ml	12 ml
CN ₂ H ₂ 0,1 M**	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Poudre A			0,4 g.		
Liquide A				8 ml	
Liquide A bouilli ***					8 ml
Poudre B		0,4 g.			
Toluène (gouttes)	6	6	6	6	6

Après 10, 20, 40, 60 et 120 minutes de séjour des fioles au bain-marie, on recherche dans les différents milieux la cyanamide libre, l'urée et l'ammoniaque à l'aide des réactifs suivants :

1) Cyanamide libre : adjonction au milieu de nitrate d'argent ammoniacal.

2) Urée : dans 10 ml. d'acide acétique on verse 5 ml. d'un des différents milieux mis en expérience et on ajoute en une seule fois 0,1 ml. d'une solution de xanthidrol à 10 % dans le méthanol.

3) Ammoniaque : milieu 1 ml., eau distillée 2 ml., réactif de Nessler : quelques gouttes.

* Tampon de Mac Ilvaine : Phosphate disodique — acide citrique pH = 7.

** Préparée au moment de l'emploi comme indiqué ci-dessus mais en ajustant le filtrat à 100 cc avec du tampon pH = 7 et non de l'eau distillée.

*** 10 ml de liquide A sont introduits dans une fiole conique de 50 ml fermée par un bouchon traversé par un long tube de verre qui sert de réfrigérant. Cette fiole est placée au bain-marie bouillant ; on compte 30 minutes à partir du commencement de l'ébullition.

C. — Résultats :

Les résultats positifs (+) ou négatifs (—) sont consignés dans les tableaux II et III ci-dessous, en fonction des temps de séjour des différents milieux au bain-marie.

TABLEAU II

Après 10 minutes de séjour au bain-marie.

	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Cyanamide	+	+	+	+	+
Urée	—	—	+	+	—
Ammoniaque	—	—	—	—	—

Après 20 minutes les résultats sont identiques : existence de cyanamide et d'urée mais absence d'ammoniaque dans E₁ et E₂. présence de cyanamide seule en T₁, T₂, E₃.

TABLEAU III

Après 40 minutes					
	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Cyanamide	+	+	—	—	+
Urée	—	—	+	+	—
Ammoniaque	—	—	—	—	—
Après 60 minutes					
	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Cyanamide	+	+	—	—	+
Urée	—	—	+	+	—
Ammoniaque	—	—	+	+	—
Après 120 minutes					
	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Cyanamide	+	+	—	—	+
Urée	+	+	+	+	+
Ammoniaque	—	—	+	+	—

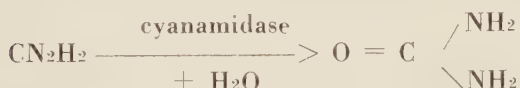
D. — Conclusions :

1) Le mycélium d'*A. niger*, ayant effectué sa croissance sur un milieu ne renfermant, comme substance azotée, que de la cyanamide, à concentration convenable, est capable d'hydrolyser la cyanamide

2) Le mycélium de la même souche, ayant poussé sur milieu de Bertrand normal (sources d'azote NO_3 et NH_4) est incapable de dégrader la cyanamide (T_2).

3) L'essai E_3 (perte du pouvoir hydrolysant par ébullition du liquide pendant 30 minutes) démontre que le catalyseur est de nature enzymatique ; l'utilisation de la cyanamide est due à la synthèse, par le Champignon, d'un enzyme d'adaptation, la cyanamidase (essais E_1 , E_2).

4) Cet enzyme opère la transformation cyanamide urée :



5) Les essais T_1 (absence de matériel enzymatique), T_2 (absence de cyanamidase), E_3 (destruction des enzymes), après 120 minutes de séjour au bain-marie des différents milieux, montrent, à nouveau, la grande labilité de la cyanamide libre. L'urée apparue dans ces fioles, en l'absence de cyanamidase ou de tout autre enzyme, provient de la dégradation spontanée de la cyanamide dans les conditions données de température, de pH et de temps.

6) L'ammoniaque décelé dans E_1 et E_2 , après 60 minutes de séjour des milieux au bain-marie, a pour origine la dégradation enzymatique de l'urée par l'uréase du mycélium d'*A. niger*.

7) En respectant certaines limites de temps (moins de 40 minutes), de façon à éviter à la fois la formation d'urée par dégradation spontanée de la cyanamide et la formation d'ammoniaque par hydrolyse enzymatique de l'urée formée, il est possible de mesurer l'activité de l'enzyme en dosant l'urée provenant de la seule action diastasique. Dans ces limites de temps (T_1 et T_2) et dans les conditions expérimentales adoptées, la stabilité de la cyanamide est totale ; elle permet d'éviter tout risque d'erreur ou tout besoin de corrections ultérieures.

II. RECHERCHE DE LA CYANAMIDASE CHEZ DIFFERENTS VEGETAUX.

Les résultats précédents concernant l'*A. niger* nous ont amené à rechercher si la cyanamidase existe également chez d'autres espèces de Champignons inférieurs et chez les Phanérogames.

A. Champignons inférieurs.

a) *Provenance.*

— Mycothèque de l'E.N.A.R.

Les premiers essais ont été effectués avec des souches d'*Aspergillus* provenant de la mycothèque du laboratoire de Technologie de l'École Nationale d'Agriculture de Rennes *.

Les trois souches de cette provenance sont :

E.N.A.R. n° 152 *Aspergillus niger* de la série *niger* apparenté par M. Sainclivier (95) d'après Thom et Raper (103) à *A. awamori* (Nakasawa).

E.N.A.R. n° 151 *A. niger* de la série *carbonarius* apparentée (provisoirement), dans son travail sur les Aspergilles, par Sainclivier à *A. pulchellus* (Thom).

E.N.A.R. n° 191 du groupe des *A. Tamarii* pour laquelle le même auteur proposait la dénomination de : *A. terricola* var. *Bronzeus*.

Dans l'ensemble de notre travail ce qui est rapporté à *Aspergillus niger* correspond à la souche E.N.A.R. n° 152.

— Mycothèque de l'E.N.A.

Les espèces suivantes nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie de l'Institut National Agronomique **.

Fusarium moniliforme Sheldon.

Fusarium coeruleum (Libert) Saccardo.

Alternaria tenuis Nees.

Cladosporium herbarum (Persoon) Link.

* Directeur : Monsieur le Professeur CALANDRON auquel nous exprimons nos très vifs remerciements.

** Directeur : Monsieur le Professeur DUCHÉ, auquel nous exprimons notre vive reconnaissance.

Isollements.

D'autres espèces proviennent d'isollements effectués par nous-même, à partir d'un sol cultivé et de débris de végétaux en voie de décomposition sur le même sol. De nombreux travaux concernant les défauts des méthodes d'isolement des Champignons du sol ont été publiés (voir en particulier le travail de WILTGEN et BONNIER) (111). Pour éviter de n'obtenir que des espèces qui sporulent facilement, appartenant notamment aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* et qui sont toujours très nombreuses sur les plaques ensemencées avec des dilutions de suspension de terre, nous avons utilisé pour l'ensemencement de gélose nutritive (Czapek-Dox et Maltea Moser 2 %) des petits grains de terre ou des débris végétaux (4 par boîte de Petri de 10 cm de diamètre). Ces boîtes ont permis des repiquages après un séjour à l'étuve, à 23°, variant entre 48 heures et 4 jours. Ces repiquages effectués en tube, sur milieu de Czapek et sur milieu au maltea, nous ont donné la possibilité, parfois après nouveaux isollements, d'obtenir en culture pure un certain nombre de souches dont la détermination a été effectuée à l'aide des ouvrages suivants :

MOREAU (74), VIENNOT BOURGIN (108), GILMAN (44), RAPER and THOM (87), THOM and RAPER (103).

Nous avons retenu de ces isollements :

Rhizopus nigricans Ehrenberg.

Mucor racemosus Fresenius.

Aspergillus repens (Corda) de Bary.

Penicillium glaucum (plusieurs souches).

Cladosporium herbarum (Persoon) Link.

Fusarium graminearum Schwabe.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) Sacc. et Trot.

D'autres espèces, enfin, ont été isolées à partir de fruits divers :

Mucor sp (I) sur *Triticum vulgare*, Vill.

Mucor sp (II) sur *Linum usitatissimum*, L.

Monilia fructigena sur *Malus sylvestris*, Mill.

Penicillium italicum Wehmer sur *Citrus aurantium*, L.

b) Culture avec différentes sources d'azote autres que la cyanamide.

Ces différents Champignons inférieurs ont été conservés en culture pure, sur milieu de Czapek ou milieu à l'extrait de malt. Le mycélium utilisé pour la recherche de la présence éventuelle de la cyanamidase a été obtenu par culture, en cuvette dans le cas d'*Aspergillus niger* et en fiole de Roux ou fiole conique dans le cas des autres espèces. Nous avons utilisé comme milieu de culture le milieu de Bertrand, mais en faisant varier les sources d'azote ; la teneur en azote du milieu étant égale à celle du milieu type, sauf dans le cas de l'urée où, après essais, nous avons retenu une concentration correspondant à la moitié de la dose normale d'azote.

Le tableau IV indique par le signe +, les diverses sources d'azote (nitrate de calcium, sulfate d'ammonium, urée, asparagine, peptone) offertes aux différentes souches.

Le mycélium obtenu en général après 36 heures de culture à 34° est lavé à l'eau ordinaire puis à l'eau distillée en exprimant l'eau, entre chaque lavage, entre des feuilles de papier à filtrer ; il est ensuite desséché sous vide en présence de chlorure de calcium. Après 24 heures de dessiccation il est réduit en poudre au moulin électrique ; cette poudre tamisée (tamis n° 80) est immédiatement utilisée ou conservée au sec et à l'obscurité le moins longtemps possible.

c) Protocole expérimental.

On place au bain-marie à 38° et à pH 7 des fioles coniques de 50 ml. contenant les milieux suivants :

	E ₁	E ₂	E ₃
Tampon pH = 7	10 ml	10 ml	10 ml
CN ₂ H ₂ M/10	10 »	10 »	10 »
Poudre de Mycélium	0,2 g.	0,4 g.	
Poudre de mycélium portée dans le tampon 30' à 100"			0,2 g.
Toluène (gouttes)	4	4	4

d) Résultats et conclusions.

Après 20, 60, 120 minutes et 24 heures de séjour au bain-marie, on recherche la présence de cyanamide, urée, ammoniacque.

Après 20 et 60 minutes on peut noter dans les trois types de fioles :

1) Cyanamide : recherche positive.

TABLEAU IV
Sources d'azote offertes aux différentes souches.

	Nitrate	Sulfate d'ammoniaque	Urée	Asparagine	Peptone
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	+				
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	+	+	+	+	+
<i>Mucor</i> Sp. I	-				
<i>Mucor</i> Sp. II	+				
<i>Moulinia fructigena</i> Pers.	+				
<i>Aspergillus niger</i> ENAR 152	+	+	+	+	+
" " ENAR 151	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> ENAR 191	+				
<i>Aspergillus repens</i> Corda de Bary	+				
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer	+				
<i>Penicillium glaucum</i> I	+	+	+	+	+
<i>Penicillium glaucum</i> II	+		+		
<i>Clad. speculum herbarum</i> Persoon Link, I, N, A	+				
<i>Clad. speculum herbarum</i> Persoon Link	+				
<i>Alternaria tenuis</i> Nees	+				
<i>Fusarium moniliforme</i> SUDLHOFF	+				
<i>Fusarium coeruleum</i> Link-Saccardo	+				
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	+				
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) Sacc et Troh.	+	+			

2) Urée : recherche négative.

3) Ammoniaque : recherche négative.

Après 120 minutes et 24 heures :

1) Cyanamide : recherche positive dans E₁, E₂, E₃.

2) Urée : recherche positive dans E₁, E₂, E₃.

3) Ammoniaque : recherche négative dans E₃.
recherche positive dans E₁, E₂.

Toutes les souches mycéliennes étudiées, cultivées sur un milieu privé de cyanamide, ne présentent aucune activité cyanamidase ; c'est d'ailleurs ce que nous avons constaté avec l'*A. niger* cultivé dans les mêmes conditions. Ces souches ont toutes manifesté une action uréasique très nette. Par contre (voir chapitre V), la plupart de ces espèces se comportent comme l'*A. niger*, lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu renfermant de la cyanamide comme seule source d'azote. On peut donc en conclure que chez les Champignons étudiés la cyanamidase est un enzyme strictement adaptatif.

B) Phanérogames.

a) *Provenance et préparation des organes végétaux.*

Parmi les végétaux essayés, toutes les plantes cultivées proviennent des collections dont nous avons à l'époque la responsabilité (E.N.A. Rennes). Ces collections étaient établies sur des terrains n'ayant pas reçu de cyanamide depuis au moins cinq ans. Les végétaux spontanés proviennent, à part quelques rares exceptions, des bordures de ces mêmes parcelles ou champs et n'ont jamais été en contact avec la cyanamide.

Les germinations (toutes les semences ayant été récoltées sur les terrains cités ci-dessus) ont été préparées, sur papier-filtre pour les semences de petites dimensions, sur sable quartzéux pour les grosses graines, en étuve à 23° et ont toujours été conduites jusqu'au stade deux feuilles. Les feuilles et tiges herbacées ont été prélevées sur des végétaux jeunes en période de grande croissance et toujours avant le début de la floraison. Les racines ont été prélevées sur des plantes très jeunes (stade 4 feuilles en moyenne) déterrées avec une grosse motte de terre ; un entraînement lent des particules de terre au jet d'eau permet de dégager la presque totalité des jeunes racines.

Dans les cas de *Trifolium pratense* L. et de *Medicago sativa* L. nous avons pu détacher sur des plantes d'un an un nombre de nodosités nous permettant de préparer une quantité suffisante de poudre d'essai.

Ce matériel végétal frais (jeunes germinations, feuilles, tiges herbacées, racines), rapidement lavé à l'eau distillée pour éliminer les traces de terre, est coupé en fragments de 0,5 cm. environ. Il est immédiatement mis à sécher sous vide en présence de chlorure de calcium. On utilise à cet effet de grandes cloches (35 litres environ) garnies de cuvettes remplies de chlorure de calcium sec et froid et on fait le vide à l'aide d'une pompe à huile. La dessiccation est généralement complète en 24 heures. Les fragments ainsi séchés sont conservés, si besoin est, mais aussi peu de temps que possible, en flacons bouchés émeri à l'obscurité et au frais. Au moment de l'emploi, on broie au moulin électrique jusqu'à obtention d'une poudre passant au tamis n° 60. Dans quelques cas (éléments fibreux) un boyage prolongé au mortier est nécessaire.

Les semences, dénomination sous laquelle nous groupons les graines nues ou vêtues et les fruits secs, ont été broyées avec leurs téguments, dans l'état de siccité où elles se trouvaient, et qui était suffisant pour permettre leur conservation au laboratoire (teneur en eau de l'ordre de 12 à 16 %). Nous n'avons pas délipidé la poudre obtenue à partir de semences riches en matières grasses. Les espèces et organes suivants ont été essayés (tableau V).

b) Protocole expérimental.

On place au bain-marie à 38° et à pH 7, des fioles coniques de 50 ml. contenant les milieux suivants :

	E ₁	E ₂	E ₃
Tampon pH = 7	20 ml	20 ml	20 ml
CN ₂ H ₂ M/10	20 »	20 »	20 »
Poudre végétale	0,4 g.	0,8 g.	
Poudre végétale portée dans le tampon pendant 30 minutes à 100°			0,4 g.
Toluène (gouttes)	6	6	6

Après 20, 60, 120 minutes et 12 heures d'expérience on recherche la présence de : cyanamide, urée, ammoniacque.

c) Résultats.

Après 20 et 60 minutes on constate dans E₁, E₂ et E₃ pour toutes les espèces et tous les organes étudiés :

TABLEAU V

Espèces choisies en vue de la détection de la Cyanamidase.

Les organes essayés sont indiqués par le signe +.

FAMILLES	ESPÈCES	Semences	Jeunes Germina- tions	Feuilles	Tiges Herbacées	Racines
HYDROCHARIDACÉES GRAMINÉES	ELODEA CANADENSIS, Rich.			+	+	
	ZEA MAYS, L.	+	+	+		+
	SORGHUM VULGARE Pers.	+		+	+	
	AVENA SATIVA, L.	+	+	+		+
	ORYZA SATIVA, L.	+	+	+		+
	ARRENATHERUM ELATIS Mert et Koch			+	-	
	HORDEUM VULGARE, L. (DISTICHUM, L.)	+	+	+		
	SECALE CEREALE, L.	+		+		
	AEGILOPS VENTRICOSUS, L. Tausch.	+		+		
	TRITICUM DICOCCTUM Schübl.	+		+		
MORACÉES	TRITICUM DURUM Desf.	+		+		
	TRITICUM VULGARE Vill.	+	+	+	+	+
	LOLIUM PERENNE, L.	+		+		
	FESTUCA ELATIOR, L.			+		
	DACTYLIS GLOMERATA, L.			+		
POLYGONACÉES	CANNABIS SATIVA, L.	+	+	+		
	HUMULUS LUPULUS L.			+	+	
	RUMEX ACETOSA L.		+	+	+	
CHENOPODIACÉES	FAGOPYRUM ESCULENTUM, Moench.	+	+	+		
	BETA VULGARIS, Moq.	+		+		

TABLEAU V (suite).

FAMILLES	ESPECES	Semences	Jeunes Germina- tions	Feuilles	Tiges Herbacées	Racines
CARIOPHYLLACÉES CRUCIFÈRES	<i>LYCHNIS GITHAGO</i> , Lam.	+				
	<i>BRASSICA JUNCEA</i> Cass.			+	+	+
	<i>BRASSICA RAPA</i> , L. (Var. <i>OLEIFERA</i>)	+		+	+	
	<i>BRASSICA NAPUS</i> L. (Var. <i>OLEIFERA</i>)			+		
PAPAVÉRACÉES	<i>CAMELINA SATIVA</i> , Crantz.			+		
LINACÉES	<i>PAPAYER SOMNIFERUM</i> L.			+	+	+
	<i>LINUM USITATISSIMUM</i> , L.			-		
EUPHORBACÉES	<i>ROGNETS COMMUNS</i> , L.			+	+	+
	<i>MERCURIALIS ANNUA</i> , L.			+		
ACERACÉES	<i>ACER NEGUNDO</i> , L.			+		
LEGUMINEUSES	<i>ACER PSEUDO-PLATANUS</i> , L.			+		
	<i>CLEEN EUROPAEUS</i> , L.				+	
	<i>SAROTHAMNUS SCOPARIUS</i> , Koch.			+	+	
	<i>LOTUS CORNICULATUS</i> , L.			+	+	
	<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> , L.			+		+
	<i>SOJA HISPIDA</i> Munch.	+	+	+	+	+
	<i>TRIFOLIUM REPENS</i> , L.	+		+	+	(nodosités isolées)
	<i>TRIFOLIUM PRATENSE</i> , L.			+	+	(nodosités isolées)
	<i>TRIFOLIUM PRATENSE</i>					+
	<i>MEDICAGO SATIVA</i> , L.			+		
	<i>MEDICAGO SATIVA</i> , L.			+	+	
	<i>MEDICAGO LUPULINA</i> , L.			+		
	<i>TRIGONELLA FOENUM GRAECUM</i> , L.	+		+		
	<i>ANTHYLLIS VULNERARIA</i> , L.			+		

TABLEAU V (fin).

FAMILLES	ESPECES	Semences	Jeunes Germina- tions	Feuilles	Tiges Herbacées	Racines
LÉGUMINEUSES	LUPINUS ALBUS, L.		+	+		
	GALEGA OFFICINALIS, L.			+		
	CICER ARIETINUM, L.	+		+	+	
	PISUM SATIVUM, L.	+	+	+		+
	LATHIRUS CICERA, L.			+		
	VICIA VARBONENSIS, L.	+		+		
	VICIA CRACCA, L.	+		+		
	FABA VULGARIS, Monch.	+	+	+		+
	ONILIS ACETOSELLA, L.			+		
	DALCIS CAROTA, L.			+		
OXALIDACEES	HERICLEUM SPONDYLUM, L.			+		
OMBELLIFÈRES	SOLANUM TUBEROSUM, L.			+	+	
SOLANACEES	THALICTUM OFFICINALE Weber ..			+		+
COMPOSEES	LACTUCA SATIVA, L.			+		
	MATRICARIA INODORA, L.			+		
	ACHILLEA MILLEFOLIUM, L.			+		
	SENECIO VULGARIS, L.			+		
	CARTHAMUS TINCTORIUS, L.	+		+		
	HELLANTHUS ANNUUS, L.	+		+	+	+
	HELLANTHUS TUBEROSUS, L.			+		

1) La présence de cyanamide (coloration jaune vif avec le nitrate d'argent ammoniacal).

2) L'absence d'urée (réaction négative au xanthidrol en milieu acétique).

3) L'absence d'ammoniaque (réaction négative au réactif de Nessler).

Après 120 minutes, la présence de cyanamide et l'absence d'ammoniaque sont également constatées, mais des traces nettes d'urée sont mises en évidence dans tous les différents milieux.

Il y a lieu de rappeler ici, que dans l'essai précédent, avec *A. niger*, on détectait dans T₁ (absence de matériel enzymatique) et T₂ (mycélium obtenu sur milieu sans cyanamide) des traces nettes d'urée après 120 minutes d'essai et que, par contre, il n'était pas possible après ce délai de mettre en évidence la cyanamide dans E₁ et E₂ (présence de matériel enzymatique). La présence d'ammoniaque a été notée dans les contenus de quelques fioles E₁ et E₂ (*Lupinus albus*, *Soja hispida*, *Oryza sativa*, *Ricinus communis*) ces plantes sont connues comme renfermant de l'uréase.

Après 12 heures d'essai, la cyanamide (coloration jaune vif avec le nitrate d'argent ammoniacal) a été retrouvée dans tous les flacons d'essai. Dans le cas de présence de cyanamidase d'*A. niger*, la disparition totale de la cyanamide avait été constatée après moins de 40 minutes d'action.

A la suite de ces essais qualitatifs, on constate que la cyanamidase n'existe pas chez les végétaux supérieurs étudiés, lorsqu'ils sont cultivés sur un sol privé de cyanamide. On peut donc penser que la cyanamidase, si elle existe chez les végétaux supérieurs cultivés en présence de cyanamide, est un enzyme d'adaptation au même titre que chez les Champignons inférieurs.

Mais la présence de cyanamidase chez les végétaux supérieurs n'est pas démontrée bien que HOFMANN, LATZKO et SUSS (50) arrivent en 1954 à cette conclusion : « Das entsprechende Enzym dürfte in höheren Pflanzen weit verbreitet sein ». Les techniques utilisées par ces auteurs ne sont pas démonstratives en raison de la grande labilité de la cyanamide en solution.

Nous avons entrepris récemment une nouvelle série d'essais dans le but d'essayer de résoudre ce problème.

III. — CYANAMIDASE ET UREASE.

HOFMANN, LATZKO, SUSS (50), faisant agir à pH 6,8 à 37° pendant 4 jours une farine commerciale de Soja sur une solution de cyanamide ont obtenu une disparition de 37,08 % de la cyanamide mise en jeu, disparition qu'ils ont rapportée à une action enzymatique. Une extraction de la farine par un mélange aqueux d'acétone à 25 % entraîna une disparition de 39,06 % en 24 heures et de 89,20 % en 144 heures de la quantité de cyanamide utilisée dans l'expérience.

Essayant de bloquer l'uréase de cette préparation par l'hydroquinone ils constatèrent l'absence de formation d'ammoniaque mais la disparition d'une partie (20,78 %) de la cyanamide. Ils estiment que le ferment qui hydrolyse la cyanamide et l'uréase sont des corps différents.

Utilisant la même farine de Soja ces auteurs préparent une uréase cristallisée (mais non recristallisée) selon la méthode de SUMNER. Cette préparation très active sur l'urée entraîne en 4 jours à 37° et à pH 6,8 une disparition de 19,6 % de la cyanamide mise au contact. Ils en concluent que la cyanamide est peu dégradée par l'uréase cristallisée.

Dans les conditions de nos essais précédents, nous n'avons jamais constaté avec la variété de Soja utilisée (Tokio jaune à œil brun) une action d'hydrolyse enzymatique de la cyanamide, nous avons donc repris l'étude de l'action possible de la farine de cette légumineuse en utilisant 5 variétés différentes (Brun hâtif Rouest, Hudson-Manchu, Cayuga, Vilmensis, 0,375 Kouban).

Nous avons obtenu la farine par broyage des graines entières (farine non délipidée) ainsi qu'un extrait eau-acétone de chacune de ces farines (10 g. de farine pour 50 ml. de mélange eau-acétone).

A pH 7 et à 37° après une heure d'action dans les conditions expérimentales précédemment décrites, aucune disparition de la cyanamide n'a été constatée (recherches de l'urée et de l'ammoniaque négatives); les prélèvements d'essais ayant été effectués toutes les 20 minutes. Après 48 heures d'action la présence de cyanamide libre est toujours constatée.

Nous avons par ailleurs utilisé deux préparations commerciales d'uréase : l'une (Photovolt U.S.A.) dont nous ignorons l'origine végétale, l'autre (B.D.H. Londres) fabriquée à partir de semences de « melon d'eau ». L'existence d'une nette activité uréasique de ces préparations a été vérifiée par voie qualitative.

Le protocole expérimental suivant a été retenu pour chacune des deux préparations d'uréase : on porte au bain-marie à 38° des fioles coniques de 50 ml. contenant les milieux suivants :

	T ₁	T ₂	T ₃
Tampon pH = 7	10 ml	10 ml	10 ml
CN ₂ H ₂ M/10	10 »	10 »	10 »
Uréase			0,2 g.
Uréase portée à l'ébullition dans le tampon		0,2 g.	
Toluène (gouttes)	4	4	4

Des prélèvements sont effectués après 30 et 60 minutes, 24 et 48 heures, pour effectuer la recherche de la cyanamide de l'urée et de l'ammoniaque.

Après 20 et 60 minutes la recherche de la cyanamide est positive, celle de l'urée et de l'ammoniaque négative.

Après 24 et 48 heures on observe :

Cyanamide : réaction positive dans T₁, T₂, E.

Urée : réaction positive dans T₁, T₂, E.

Ammoniaque : réaction négative dans T₁, T₂.

réaction positive dans E.

L'absence de production d'urée après 60 minutes d'action semble peu favorable à l'hypothèse d'une action possible de l'uréase sur la cyanamide.

Le dosage de la cyanamide libre après 24 heures d'action des uréases actives (E₂) ou inactivées par ébullition (T₂) a permis de vérifier que l'uréase n'hydrolyse pas la cyanamide.

Un prélèvement de 10 ml. du milieu réactionnel est acidifié jusqu'à pH 6 par quelques gouttes d'acide nitrique N/10 et filtré pour éliminer les particules solides des préparations d'uréase. La cyanamide non transformée est immédiatement précipitée sous forme de sel d'argent par un excès de solution de NO₃Ag N/100 (20 ml.). Le précipité argentique est séparé par filtration et rincé ; on titre dans le filtrat l'argent restant au moyen d'une solution de sulfocyanure d'ammonium N/100 en présence d'alun de fer comme indicateur (Méthode CHARPENTIER et VOLHARD).

Les résultats correspondant à une moyenne de trois prélèvements ont été les suivants (Tableau VI) :

TABLEAU VI

	SCNNH ₄ ml	Cyanamide restant %
Uréase I (Photovolt)		
T ₂	12,4	92,43
E	12,7	92,24
Uréase II (B.D.H.)		
T ₂	13,1	93,10
E	12,9	93,00

Ces constatations sont à rapprocher des faits suivants :

1) Après LAMAIRE et BRUNEL, nous avons montré que le mycélium d'*A. niger* cultivé en absence de cyanamide est incapable de dégrader cette amide. On sait par contre, et nous l'avons vérifié pour la souche utilisée, que, comme la graine de Soja, le mycélium de ce Champignon renferme toujours de l'uréase.

2) Les différents Champignons inférieurs utilisés contiennent de l'uréase, ce qui explique la réaction positive de l'ammoniaque dans les foles après 12 heures de contact. Cet ammoniaque a pour origine l'urée provenant de l'hydrolyse spontanée de la cyanamide. Comme *A. niger* les autres Champignons figurant dans l'essai contiennent de l'uréase mais ne possèdent pas de cyanamidase.

3) Ainsi que nous le verrons par la suite (Chap. IV) certains inhibiteurs de l'uréase (acide ascorbique, tryptase) sont sans action sur l'activité de la cyanamidase.

On retrouve ici la spécificité bien connue de l'uréase signalée d'ailleurs dès les premiers travaux sur cet enzyme chez les végétaux par TAKEUCHI en 1909 et ARMSTRONG et HORTON en 1913 (in 35).

Ces éléments permettent d'affirmer que, du moins dans les conditions expérimentales réalisées :

1) La graine de Soja, tout au moins celle récoltée sur des plantes n'ayant pas reçu de fumure à base de cyanamide, ne contient pas de cyanamidase.

2) Uréase et cyanamidase sont deux enzymes absolument distincts.

3) L'uréase n'a aucun pouvoir d'hydrolyse à l'égard de la cyanamide.

IV. — CONCLUSIONS.

La cyanamidase rencontrée dans le mycélium d'*Aspergillus niger* obtenu sur milieu de Bertrand, contenant comme seule source d'azote de la cyanamide, doit être considérée chez ce Champignon comme un enzyme strictement adaptatif (KARSTROM) ou enzyme induit (COHN, MONOD, etc.).

Cet enzyme n'a jamais été rencontré dans les végétaux étudiés, tant Phanérogames que Champignons, lorsque ces végétaux croissent au dépens d'un milieu privé de cyanamide.

La cyanamidase est totalement différente de l'uréase, enzyme qui est sans action sur la cyanamide.

L'activité cyanamidasique du mycélium d'*A. niger* peut être mesurée, moyennant un minimum de précautions expérimentales, en dosant l'urée formée.

CHAPITRE IV

Caractères de l'Hydrolyse enzymatique de la cyanamide par « *Aspergillus niger* » Van Thieg. et facteurs conditionnant l'activité de l'enzyme

I. OBTENTION DU MATERIEL ENZYMATIQUE.

II. ACTION DE QUELQUES CONDITIONS DE CULTURE SUR
LA CROISSANCE ET LA TENEUR EN CYANAMIDASE DU
MYCELIUM.

A — Teneur en cyanamide du milieu de culture.

B — Apports d'éléments complémentaires au milieu de
culture.

1) *Complexe vitaminique B.*

2) *Acides aminés.*

III. MESURE DE L'ACTIVITE CYANAMIDASIQUE.

IV. DÉTERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION.

V. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

VI. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

VII. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATALYSEUR.

VIII. MARCHE DU PROCESSUS ENZYMATIQUE EN FONCTION
DU TEMPS.

IX. ACTION DES EFFECTEURS.

A — Cations divalents.

B — Acide ascorbique.

C — Tryptase.

D — Acide cyanhydrique.

E — Quinone.

F — Quinone + Glutathion.

X. CONCLUSIONS.

Caractères de l'Hydrolyse enzymatique de la cyanamide par « *Aspergillus niger* » Van Thieg. et facteurs conditionnant l'activité de l'enzyme

I. OBTENTION DU MATERIEL ENZYMATIQUE.

Le mycélium ayant servi à toutes les déterminations quantitatives a été obtenu par culture sur milieu de Bertrand dans les mêmes conditions que celles qui ont été indiquées plus haut (Chap. III). La cyanamide constitue la seule source d'azote, la concentration en cyanamide dans le milieu correspond toujours, en azote, au cinquième de la teneur normale. Après 36 heures de culture à 34° le mycélium est rincé, séché sous vide en présence de chlorure de calcium, broyé et tamisé. Une macération au 1/20 dans le tampon de Mac-Ilvaine phosphate disodique-acide citrique est immédiatement préparée. Le mélange poudre-tampon additionné de quelques gouttes de toluène (4 pour 20 ml.) est agité et abandonné 24 heures au réfrigérateur (+ 4°), on centrifuge et on filtre sur coton pour éliminer la poudre de mycélium. La cyanamidase est nettement un lyoenzyme et se laisse très facilement extraire par simple macération dans l'eau ou un milieu tampon. L'extraction n'est toutefois pas totale, différentes déterminations quantitatives ont montré qu'à poids égal de mycélium la macération au 1/20 avait un pouvoir enzymatique de l'ordre de 77 % de celui de la poudre. Ces macérations perdent très rapidement leur activité cyanamidasique. Après 48 heures de conservation à + 4° on observe une perte de pouvoir enzymatique de près de 40 %.

II. ACTION DE QUELQUES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA CROISSANCE ET LA TENEUR EN CYANAMIDASE DU MYCELIUM.

A. — Teneur en cyanamide du milieu de culture.

Ainsi que Y. LAMAIRE et A. BRUNEL (64) l'ont signalé on constate que si, dans le milieu de Bertrand, on remplace la totalité de l'azote

apporté par les sels ammoniacaux et les nitrates par une quantité équivalente d'azote fournie par une solution de cyanamide, le Champignon ne se développe pas. En réalité à 34° le début de la croissance est observé 12 jours après la mise en culture, le mycélium est épais et très plissé mais ne présente pas, à poids égal, de pouvoir cyanamidique supérieur à celui qui est obtenu dans les conditions signalées plus haut. Il y a lieu de rapporter le lent démarrage de croissance à la toxicité et à la labilité de la cyanamide. Après 12 jours de conservation à 34° une partie importante de la cyanamide a disparu, s'étant transformée en urée. Le Champignon a commencé son développement (germination des conidies) au moment où la teneur en cyanamide du milieu était suffisamment basse et où l'urée issue de la transformation de la cyanamide pouvait être utilisée.

L'apport de saccharose supplémentaire jusqu'à 90 g par litre, au lieu de 45, n'entraîne aucune amélioration de la culture.

Si au lieu d'apporter une quantité d'azote correspondant au cinquième de la dose normale, on fournit au Champignon l'azote cyanamidique à une concentration correspondant aux deux cinquièmes de la dose normale le mycélium est obtenu avec 48 heures de retard par rapport au premier milieu ou par rapport au milieu de Bertrand normal (nitrate + sulfate d'ammoniaque). Là encore le pouvoir cyanamidique du mycélium n'est pas augmenté.

Le début de croissance n'a pu se faire qu'après transformation naturelle d'une partie de la cyanamide apportée. On peut donc considérer que dans les conditions de nos cultures (milieu de Bertrand à 34°) la cyanamide interdit la croissance du Champignon au delà d'une concentration correspondant à 0,23 g. d'azote par litre.

B. — Apports d'éléments supplémentaires au milieu de culture.

Dans la bibliographie relative à la production des enzymes d'adaptation par les bactéries, il est fréquent de voir relater la nécessité pour la production de tel ou tel enzyme, de l'apport dans le milieu de culture d'éléments vitaminiques ou d'acides aminés indispensables pour la synthèse de l'enzyme adaptatif considéré. Des essais, dont certains vont être repris, ont été tentés dans ce sens.

1) *Complexe vitaminique B.*

L'apport d'éléments du complexe vitaminique B a été effectué sous forme d'extrait de levure (Difco) à la dose faible de 0,1 %, de façon à réduire au maximum l'azote non cyanamidique du milieu.

Les cultures ont été faites en ballons de 2.000 ml. sur 400 ml. de milieu de Bertrand avec 1/5 de la dose normale d'azote sous forme

de cyanamide. Après 36 heures de culture le mycélium récolté est séché et pesé.

L'augmentation de poids est particulièrement nette en présence de complexe vitaminique B :

1) sans extrait de levure 1,355 g.

2) avec extrait de levure 2,041 g.

Soit une augmentation pondérale de 33,5 %.

L'étude du pouvoir cyanamidase des deux mycélium a ainsi été effectuée : on porte au bain-marie des fioles contenant les milieux répondant aux compositions suivantes :

Tampon pH = 7	10 ml.
CN ₂ H ₂ M/10	10 ml.
Poudre de mycélium	0,4 g.
Toluène (gouttes)	4

Le dosage de l'urée formée après des temps de 20 et 35 minutes sur des prélèvements de 5 ml., donne les résultats suivants en poids de dioxanthylurée (mg.) :

TABLEAU VII

	Après 20 minutes	Après 35 minutes
Essai 1	11,2	28,8
Essai 2 (avec vit. B)	11,8	28,2

On peut donc conclure que dans les conditions de l'expérience l'apport d'extrait de levure entraîne une très sensible augmentation du poids du mycélium mais ne détermine pas d'augmentation du pouvoir cyanamidase. Le rôle exact du complexe vitaminique B n'a pas été élucidé.

2) Acides aminés.

Dès peptones d'origines diverses (viande, caséine) et des hydrolysats de caséine ajoutés au milieu de culture à raison de 0,1 % et 0,3 % n'ont entraîné aucune augmentation du pouvoir cyanamidase du mycélium récolté. Il ne semble donc pas que la synthèse de la cyana-

midase par *A. niger* soit limitée par l'absence de tel ou tel acide aminé. L'apport des mêmes produits aux mêmes concentrations, à des milieux contenant une dose d'azote cyanamidique correspondant aux deux cinquièmes de la teneur normale, n'a modifié en rien la vitesse de développement du mycélium ni son pouvoir hydrolysant vis-à-vis de la cyanamide.

III. — MESURE DE L'ACTIVITE CYANAMIDASIQUE.

Ainsi que nous l'avons montré plus haut (chap. III), il est possible, en respectant certaines limites de temps, de mesurer l'activité cyanamidase d'une préparation enzymatique obtenue dans les conditions indiquées en dosant l'urée formée. Nous avons procédé selon la technique de FOSSE (32) (33) (34) avec adjonction de xanthidrol en une seule fois. Le précipité a, en général, été recueilli sur filtre de FOSSE et pesé directement sur le plateau de la balance, dans quelques cas des creusets en verre fritté G 3 ont été utilisés.

IV. — DÉTERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION.

Nous avons retenu pour cette étude les tampons ci-après :

- I. Phosphate disodique-acide citrique
de Mac-Illvaine : pH 3 à 8.
- II. Phosphate monopotassique-phosphate disodique
de Sorensen : pH 5,3 à 8,3.
- III. Véronal sodique-acide chlorhydrique
de Michaelis : pH 7 à 9,4.
- IV. Phosphate monopotassique-borate de sodium
de Kolthoff : pH 6 à 9.
- V. Acide borique-chlorure de potassium-carbonate de sodium
de Atkins et Pantin : pH 7,8 à 11.

Le protocole expérimental est identique pour tous les tampons : on place au bain-marie des fioles coniques contenant des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E	T
Tampon de pH variable	10 ml	10 ml
Substrat (CN_2H_2 M/10)	10 ml	10 ml
Matériel enzymatique (poudre A) *	0,2 g.	
Toluène (gouttes)	4	4

Après 20 minutes d'action on dose l'urée formée. Les résultats exprimés en poids de dixanthylurée sont reportés dans les tableaux ci-dessous et ont servi à tracer les courbes de la figure 1, page 52.

* Voir page 26.

Les pH indiqués correspondent à la valeur initiale du pH du milieu réactionnel (mélange tampon + substrat).

TABLEAU VIII

Tampon Phosphate disodique-acide citrique (I)

Valeur des pH	3	4	5	6	7	8
Poids de dioxanthylurée (mg.)	0,4	2,15	5,0	9,4	21	20,1

TABLEAU IX

Tampon Phosphate monopotassique + phosphate disodique (II)

Valeur des pH	6	7	8
Poids de dioxanthylurée (mg.)	10,3	20,37	18,7

TABLEAU X

Tampon Véronal sodique-acide chlorhydrique (III)

Valeur des pH	7	8	9
Poids de dioxanthylurée (mg.)	20	18,1	14,2

TABLEAU XI

Tampon Phosphate monopotassique-Borate de sodium (IV)

Valeur des pH	6	7	8
Poids de dioxanthylurée (mg.)	6,2	12,8	8,2

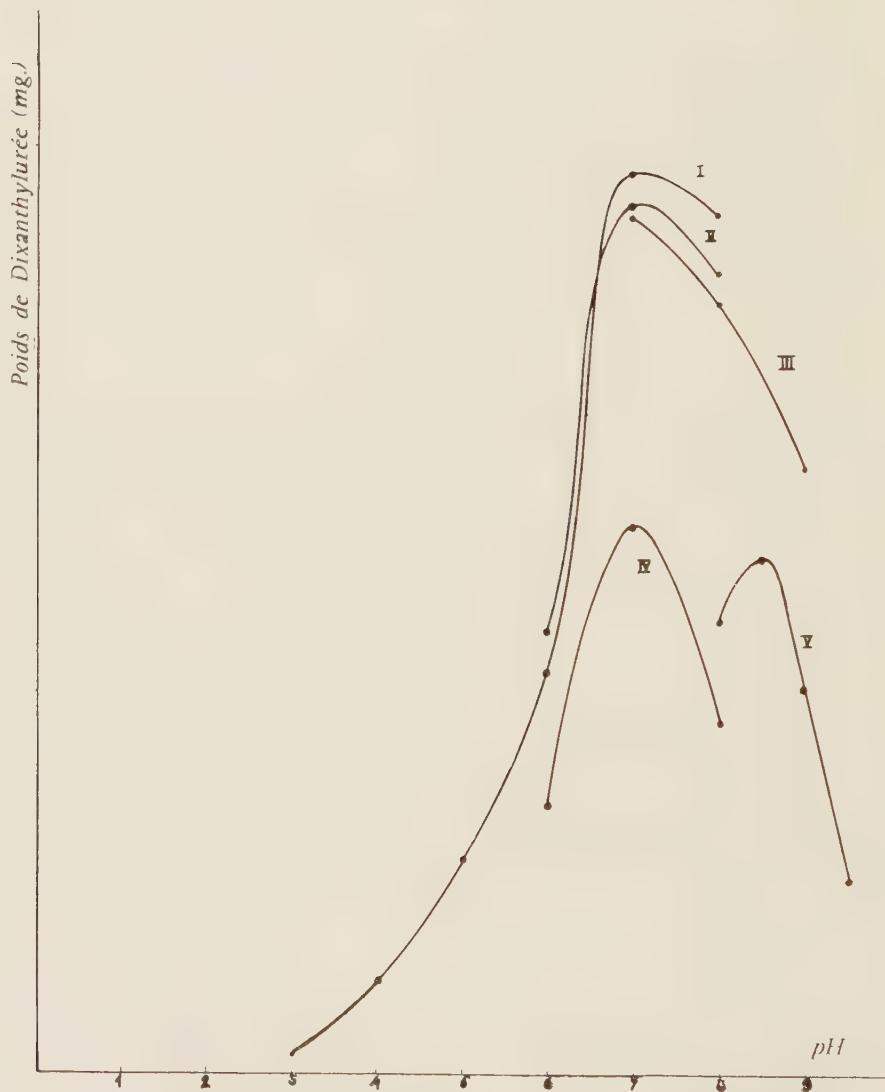


TABLEAU XII
Tampon Acide borique-chlorure de potassium (V)

Valeur des pH	8	8,5	9	9,5	10
Poids de dioxanthylurée (mg.)	10,5	12,0	9,0	4,5	traces

Pour la plupart des tampons la zone de l'optimum de pH est comprise entre 6,5 et 7,5. Une nouvelle série d'essais pour le pH compris dans cette zone mais, de 0,2 en 0,2 unité pH, nous ont permis avec le tampon phosphate disodique-acide citrique de déterminer le pH optimum pour les conditions expérimentales retenues.

TABLEAU XIII
Tampon Phosphate disodique-acide citrique (I)

Valeur des pH	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4
Poids de dioxanthylurée (mg.)	26	28,9	29,2	25,9	24,2

Dans nos conditions expérimentales le pH optimum est très voisin de 7 avec les tampons I, II et IV.

L'activité enzymatique est du même ordre de grandeur dans le cas des tampons I, II et III. Le tampon I Phosphate disodique-acide citrique ayant entraîné le plus fort pourcentage de transformation du substrat a été retenu pour les essais ultérieurs.

La nature des constituants du mélange tampon présente une influence notable dans le cas des tampons IV et V. Ces deux mélanges à base de borate de sodium (IV) et d'acide borique (V) entraînent une très nette diminution de l'activité enzymatique.

Avec le tampon V acide borique-chlorure de potassium on observe un déplacement de l'optimum : 8,5 au lieu de 7 non observé avec le tampon IV phosphate monopotassique-borate de sodium.

V. — INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

On place au bain-marie, à différentes températures, des milieux répondant aux compositions suivantes :

Tampon pH = 7	4 gouttes.
CN ₂ H ₂ M/10	4 ml.
Matériel enzymatique	10 ml.
Toluène	6 ml.

Après 30 minutes d'action on dose l'urée dans un prélèvement de 5 ml. Les résultats réunis dans le tableau ci-dessous ont permis de tracer la courbe 2, page 55.

Températures	Poids de dixanthylurée (mg.)
25°	10,5
30°	15,9
35°	22,5
40°	26,7
45°	31,0
50°	36,0
55°	34,1
60°	29,1
65°	24,0
70°	13,0

Dans ces conditions expérimentales la température optimum d'action de l'enzyme est voisine de 50°.

VI. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

L'influence de la concentration en substrat a été étudiée en utilisant comme matériel enzymatique d'une part de la poudre de mycélium (poudre A*) et d'autre part le liquide d'extraction A**.

Les protocoles expérimentaux ont été les suivants :

1) Poudre de mycélium :

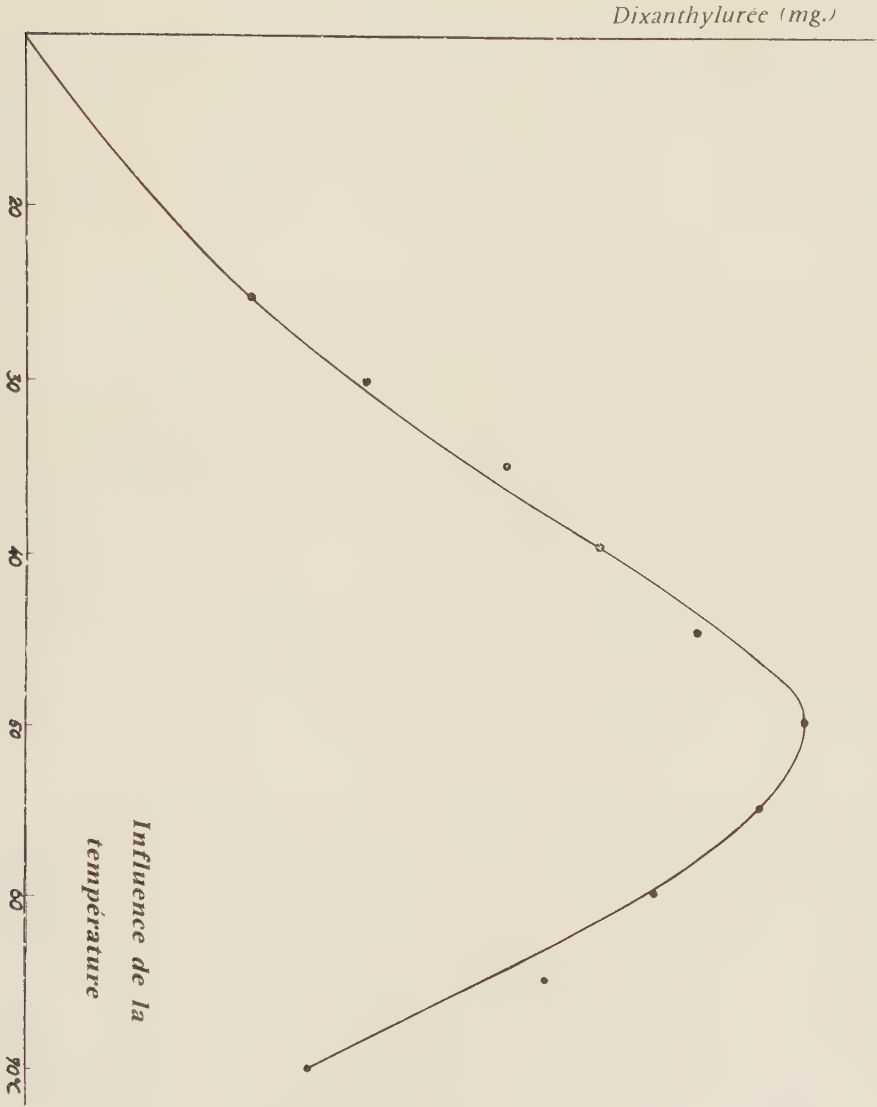
	1	2	3	4
Tampon pH = 7	17,5 ml	15 ml	10 ml	5 ml
CN ₂ H ₂ M/10	2,5 »	5 »	10 »	15 »
Poudre de mycélium	0,2 g.	0,2 g.	0,2 g.	0,2 g.
Toluène (gouttes)	4	4	4	4

2) Liquide d'extraction A :

	1	2	3	4	5	6
Tampon pH = 7	13,5 ml	11 ml	8,5 ml	6 ml	3,5 ml	1 ml
CN ₂ H ₂ M/10 ...	2,5 »	5 »	7,5 »	10 »	12,5 »	15 »
Macération	4 »	4 »	4 »	4 »	4 »	4 »
Toluène (gouttes)	4	4	4	4	4	4

* Voir page 26.

** Voir page 27.



Après une demi-heure d'action à la température optimum on détermine la quantité d'urée formée. Les résultats consignés dans le tableau XIV ont permis de dresser les courbes correspondantes (page 57).

TABLEAU XIV

Concentration en substrat			Poids de dixanthylurée (mg.)	
CN ₂ H ₂ M/10 ml.	mg.	mol.	Poudre	Macération
2,5	10,5	M/800	24,7	16,5
5	21	M/400	31	23,5
7,5	31,5	M/266	—	30,2
10	42	M/200	42	36,1
12,5	52,5	M/160	—	31,6
15	63	M/133	40	25,3

On observe ainsi que la transformation est proportionnelle à la concentration en substrat jusqu'à une limite correspondant dans les deux cas à une concentration égale ou supérieure à M/200.

VII. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATALYSEUR.

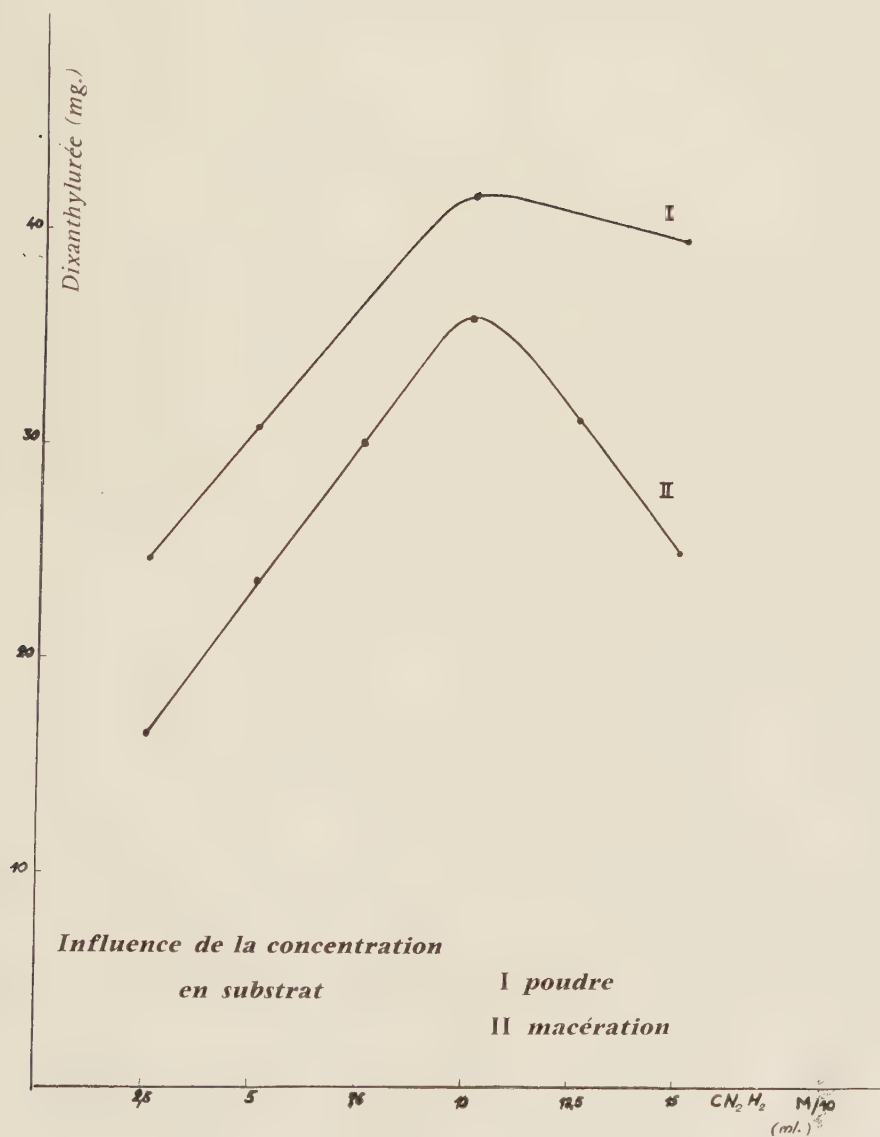
On porte au bain-marie des milieux renfermant des quantités croissantes de liquide A* pour une même dose de substrat et un volume de milieu réactionnel égal dans tous les cas. Les dosages d'urée sur des prélèvements de 5 ml. après 20 minutes d'action ont fourni les chiffres ci-dessous qui ont permis de tracer la courbe 4, page 58.

TABLEAU XV

Essais	Liquide A (ml.)	Tampon pH = 7. ml.	CN ₂ H ₂ M/10 ml.	Poids de dixanthylurée (mg)
1	2	8	10	6,0
2	3	7	10	8,4
3	4	6	10	11,6
4	5	5	10	14,0
5	6	4	10	16,4
6	7	3	10	19,6

Dans ces conditions expérimentales l'hydrolyse enzymatique de la cyanamide est proportionnelle à la concentration en catalyseur.

* Voir page 27.





VIII. — MARCHE DU PROCESSUS ENZYMATIQUE EN FONCTION DU TEMPS.

On place au bain-marie une fiole contenant un milieu répondant à la composition suivante :

Tampon pH = 7	18 ml.
CN ₂ H ₂ M/10	30 ml.
Matériel enzymatique (liquide A*)	12 ml.

Toutes les cinq minutes un prélèvement de 5 ml. permet de doser l'urée formée. Les résultats consignés dans le tableau XVI ont permis de dresser la courbe 5, page 60.

TABLEAU XVI

Temps en minutes	Poids de dixanthylurée (mg.)	% de substrat hydrolysé
5	6,8	6,47
10	12,0	11,42
15	16,8	16,0
20	22,8	21,71
25	27,0	25,71
30	30,2	28,76
35	33,7	32,09
40	37,4	35,60

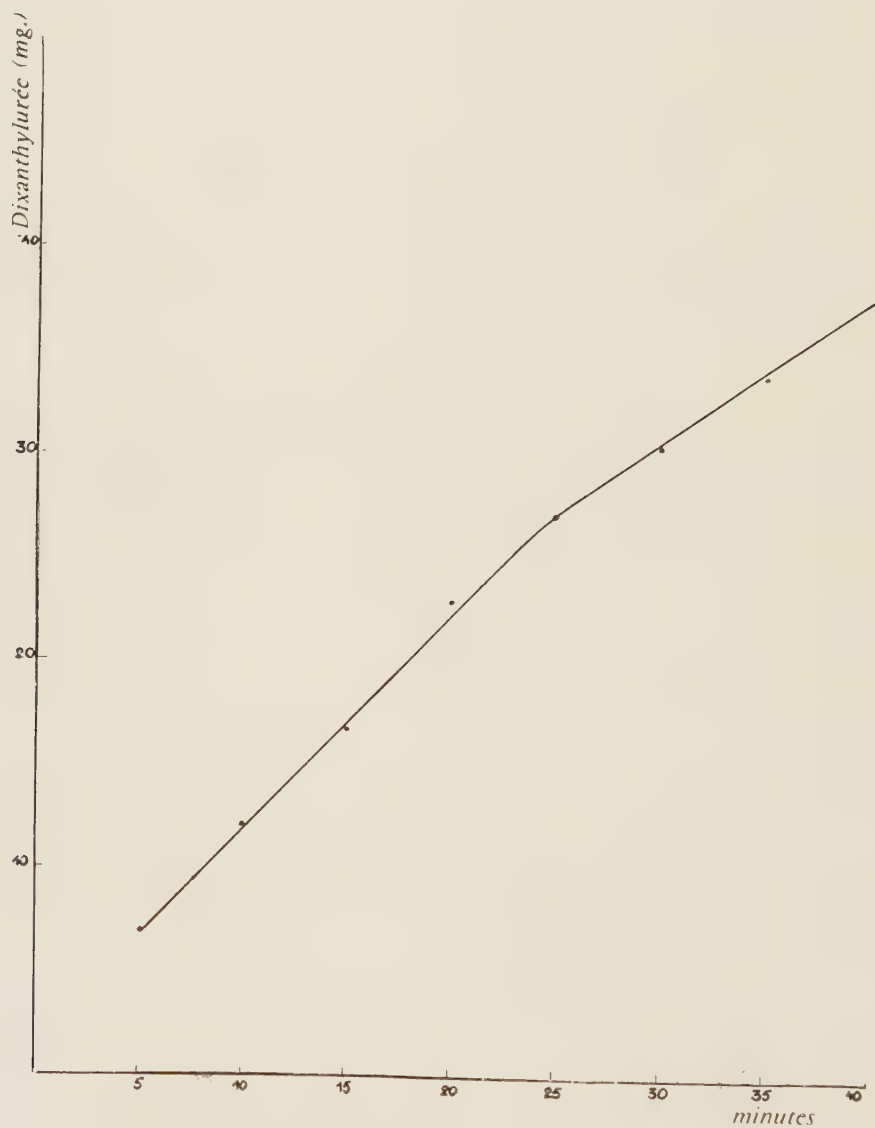
Pendant les premiers temps d'action (25 minutes) l'allure linéaire de la courbe permet d'assimiler l'hydrolyse enzymatique de la cyanamide à une réaction d'ordre nul.

IX. — ACTION DES EFFECTEURS.

A. — Cations divalents.

Nous avons étudié dans les conditions optimales d'action de l'enzyme l'influence de certains cations divalents aux concentrations (en cations) de 0,001 M, 0,0005 M, 0,00001 M introduits à l'état de sulfate

* Voir page 27.



(Cu^{++}) chlorure (Hg^{++}) et acétate (Pb^{++}). Pour chacun des cations essayés le protocole expérimental a été le suivant :

	T	T ₁	E ₁	E ₂	E ₃
Tampon pH = 7	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
CN ₂ H ₂ M/10 ...	10 »	10 »	10 »	10 »	10 »
Liquide A	—	4 »	4 »	4 »	4 »
Inhibiteur					
0,001 M ..	—	—	+	—	—
0,0005 M ..	—	—	—	+	—
0,00001 M ..	+	—	—	—	+
Toluène (gouttes)	4	4	4	4	4

Après vingt minutes d'action on dose l'urée dans un prélèvement de 5 ml. dans chacune des fioles d'essai.

Les résultats sont réunis dans le tableau ci-dessous (T₁ = 20,2 mg en dixanthylurée).

TABLEAU XVII

Cation étudié	0,00001 M		0,0005 M		0,001 M	
	Poids du précipité	Inhibition %	Poids du précipité	Inhibition %	Poids du précipité	Inhibition %
Cu ++	15,4	23,7	5,3	73,7	traces	100
Hg ++	10,5	48,0	3,1	84,6	0	100
Pb ++	18,4	8,9	4,7	76,7	0	100

L'analyse de l'urée dans les témoins montre que les cations envisagés n'ont par eux-mêmes aucune action hydrolysante sur la cyanamide. Le pourcentage d'inhibition est variable avec les cations, surtout aux faibles concentrations de ces derniers, mais l'inhibition est totale avec les ions Hg^{++} et Pb^{++} et quasi totale pour Cu^{++} pour les concentrations de 0.001 M.

B. — Acide ascorbique.

L'acide ascorbique, connu comme inhibiteur de l'uréase, a été essayé aux concentrations de 0,001 M, 0,0005 M, 0.00001 M. Après 25 minutes d'action, dans les conditions expérimentales habituelles, on obtient respectivement les poids suivants de dixanthylurée.

* Voir page 27.

Témoin T	26,2 mg
T + 0,001 M	26,8 mg
T + 0,0005 M	27,0 mg
T + 0,00001 M	26,0 mg

On peut donc conclure qu'à ces concentrations l'acide ascorbique est sans action sur le pouvoir hydrolysant de la cyanamidase.

C. — Tryptase.

Pour cet essai nous avons procédé de la manière suivante :

On met à macérer à pH 7 et à 36° pendant 6 heures en agitant toutes les demi-heures 20 ml. de liquide A* avec 0,5 g. de poudre de trypsine. 20 ml. le liquide A sont soumis aux mêmes conditions mais sans poudre de trypsine pour servir de témoin.

Après filtration ces liquides sont utilisés comme matériel enzymatique selon le protocole expérimental habituel. Après 20 minutes d'action les poids de dixanthylurée sont respectivement de :

T : 0,0160 g.
E : 0,0164 g.

Dans ces conditions expérimentales la tryptase est sans action sur la cyanamidase.

D. — Acide cyanhydrique.

Préparation. — On détermine la quantité d'HCl (N) nécessaire pour neutraliser 10 ml d'une solution à 6 % de CNK pur en présence de l'indicateur de Tashiro (8,2 ml. HCl N).

Essai. — Au moment de l'emploi on prépare la solution qui est utilisée à raison de 0,2 - 1 - 2 ml pour 10 cc du milieu d'essai.

Le protocole expérimental est le suivant :

	T	T ₁	E ₂	E ₃
Matériel enzymatique	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Substrat CN ₂ H ₂ M/10	10 »	10 »	10 »	10 »
Tampon	6 »	5,6 »	4 »	2 »
CNH		0,4 »	2 »	4 »
Toluène (gouttes)	4	4	4	4

Après 20 minutes on détermine la quantité d'urée dans un prélèvement de 5 ml.

* Voir page 26.

Résultats :

TABLEAU XVIII

Essais	Poids de dixanthylurée (mg.)	Inhibition %
T	23,6	—
E ₁	4,2	82,2
E ₂	traces	100
E ₃	0	100

Dans ces conditions expérimentales l'acide cyanhydrique s'est donc révélé un puissant inhibiteur de la cyanamidase.

E. — Quinone.

L'inhibition totale obtenue, aux concentrations de 0,001 M. avec les ions Hg^{++} et Cu^{++} permet de supposer que la présence des groupes SH libres est indispensable à l'activité de l'enzyme (31) (19). Pour vérifier cette hypothèse nous avons étudié l'action d'un inhibiteur du groupe SH : la quinone (19).

On porte au bain-marie des milieux correspondant aux compositions suivantes :

	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
Liquide A *	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
CN ₂ H ₂ M/10	10 »	10 »	10 »	10 »	10 »
l'ampon	6 »	10 »	6 »	6 »	6 »
Quinone	—	0,001 M	0,00001 M	0,0005 M	0,001 M
Toluène (gouttes)	4	4	4	4	4

Après 20 minutes d'action les poids de dixanthylurée sont respectivement :

TABLEAU XIX

Essais	Poids du précipité (mg)	Inhibition %
T ₁	26,0	—
T ₂	0	—
E ₁	23,1	10,1
E ₂	14,9	50,0
E ₃	12,8	42,6

* Voir page 27.

L'action inhibitrice de la quinone se manifeste déjà à la concentration de 0,00001 M (10 % d'inhibition), toutefois cette action inhibitrice n'est pas proportionnelle à la concentration de ce corps.

F. — Quinone + Glutathion.

L'action inhibitrice de la quinone paraît confirmer les résultats obtenus avec l'ion mercurique. Une confirmation supplémentaire semble possible dans l'étude de l'action conjointe de la quinone et d'un corps à groupe SH libre comme le glutathion.

Le protocole expérimental suivant a été retenu :

	T ₁	T ₂	T ₃	E ₁	E ₂
Matériel enzymatique	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Substrat	10 »	10 »	10 »	10 »	10 »
Tampon	6 »	6 »	6 »	6 »	6 »
Quinone	—	0,00001 M	—	0,00001 M	0,001 M
Glutathion	—	—	0,00001 M	0,00001 M	0,001 M
Toluène (goutes)	4	4	4	4	4

Après 20 minutes les doses d'urée sur un prélèvement de 5 ml sont les suivantes exprimées en mg. de dioxanthylurée.

$$T_1 = 20.1$$

$$T_2 = 18.1$$

$$T_3 = 20.2$$

$$E_1 = 20.2$$

$$E_2 = 18.2$$

A la concentration de 0,00001 M le glutathion n'a, dans ces conditions expérimentales, aucune action d'activation ou d'inhibition sur la cyanamidase. L'hydrolyse enzymatique de la cyanamide ayant été égale en T₁ et T₃.

A faible concentration (0,00001 M) la quinone entraîne un pourcentage d'inhibition de 9,9 % (T₂). Cette légère action inhibitrice disparaît totalement en présence de glutathion (E₁).

Par contre à la concentration de 0,001 M l'action inhibitrice de la quinone reste manifeste mais beaucoup plus limitée qu'en absence de glutathion. Dans l'essai précédent, la quinone seule (E₃, tableau XIX) entraînait une inhibition de 50 %. En présence de glutathion (E₂) la quinone, à la même concentration, ne présente plus qu'une action inhibitrice de 9,5 % par rapport au témoin (T₁).

On retrouve ici le fait signalé pour l'urée (18), l'inhibition causée par la quinone est levée par un anti-inhibiteur à fonction thiol.

Ainsi que nous l'avons signalé au chapitre précédent, l'acide ascorbique et la tryptase, inhibiteurs connus de l'uréase, sont sans effet sur la cyanamidase. Ce fait constitue un argument supplémentaire en faveur de la distinction totale qui doit être établie entre cyanamidase et uréase.

L'action inhibitrice de l'ion mercurique et de la quinone, la levée de l'inhibition quinonique par le glutathion font apparaître la présence de groupes SH dans l'enzyme et la nécessité pour ce groupe thiol d'être à l'état libre pour que l'hydrolyse enzymatique se produise.

X. — CONCLUSIONS.

1) La cyanamidase est un lyoenzyme facilement extractible par l'eau ou les milieux tampons. L'extraction bien qu'incomplète est importante, elle a été mesurée.

2) La cyanamide qui peut être utilisée comme source d'azote par *A. niger* doit être considérée comme un toxique interdisant tout développement du Champignon jusqu'à une concentration maximum en azote de 0,23 g. par litre dans les conditions de culture que nous avons observées.

3) Les quelques essais de modification du milieu de culture montrent que, jusqu'à présent, il n'a pas été possible de modifier le pouvoir cyanamidasiqne du mycélium. Il faut noter le rôle important du complexe vitaminique B, qui sans entraîner d'augmentation du pouvoir hydrolysant vis-à-vis de la cyanamide entraîne une nette augmentation de poids du mycélium récolté.

4) Les propriétés générales de l'enzyme (pH, température, concentration en substrat, concentration en catalyseur, marche en fonction du temps) ont été déterminées. La température optimum d'action (50°) est relativement élevée.

5) L'étude de l'action des effecteurs, tout en amenant à préciser les propriétés générales de l'enzyme étudié a permis de mettre en évidence deux faits importants :

a) Cyanamidase et uréase sont deux enzymes absolument distincts.

b) Intervention des groupes thiols dans le processus d'hydrolyse enzymatique de la cyanamide.

CHAPITRE V.

Propriétés cyanamidasiques de quelques champignons inférieurs

I. CROISSANCE DE DIVERS CHAMPIGNONS EN PRESENCE DE CYANAMIDE COMME SEULE SOURCE D'AZOTE.

II. ACTIVITE CYANAMIDASIQUE.

A. Unité d'activité et valeur cyanamidasique.

B. Valeur cyanamidasique des Champignons étudiés.

III. CONCLUSIONS.

Propriétés cyanamidiques de quelques champignons inférieurs

I. -- CROISSANCE DE DIVERS CHAMPIGNONS EN PRESENCE DE CYANAMIDE COMME SEULE SOURCE D'AZOTE.

Les essais de croissance des différents Champignons inférieurs étudiés ont été effectués en ballons de 2 litres sur 400 ml. de milieu. Nous avons mis en comparaison la cyanamide et le nitrate d'ammoniaque apportés chacun à la dose de 0,234 g. d'azote par litre ($\frac{1}{5}$ de la dose normale du milieu de Bertrand). La solution de cyanamide stérilisée par filtration à la bougie a été ajoutée aseptiquement au reste du milieu préalablement stérilisé à l'autoclave : le milieu témoin au nitrate d'ammoniaque a été stérilisé en totalité et en une seule fois à l'autoclave. Les Champignons ayant servi à l'ensemencement étaient entretenus, depuis plusieurs repiquages, sur milieu à l'extrait de malt à 20 ‰.

Après environ 36 heures de culture les mycélium sont récoltés, rincés, essorés et mis à sécher selon la technique décrite antérieurement. Les pesées ont été effectuées après 24 heures de dessiccation, le broyage et l'utilisation comme matériel enzymatique ayant eu lieu aussitôt après la pesée. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XX

ORGANISMES ETUDIÉS	Poids en g. de mycelium sec		Rapport P2/P1
	Sur milieu témoin (P1)	Sur milieu à la cyanamide (P2)	
<i>Aspergillus niger</i> E.N.A.R. 152	2,01	1,47	73,1
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	0,91	0,62	68,1
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	0,82	0,56	68,2
<i>Mucor</i> sp. I	0,71	0,47	66,1
<i>Mucor</i> sp. II	0,66	0,41	62,1
<i>Monilia fructigena</i> Pers.	0,41	0,27	65,8
<i>Aspergillus niger</i> E.N.A.R. 151	2,14	1,70	79,4
<i>Aspergillus lanarius</i> E.N.A.R. 191	1,07	0,74	69,1
<i>Aspergillus repens</i> (Corda, de Bary	1,32	0,97	73,4
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer	0,72	0,53	73,6
<i>Penicillium glaucum</i> souche I	1,25	0,94	75,2
<i>Penicillium glaucum</i> " II	0,81	0,94	75,2
<i>Cladosporium herbarum</i> Persoon Link, I.N.A.	0,67	0,47	70,1
<i>Cladosporium herbarum</i> Persoon Link isolé	0,75	0,54	72,0
<i>Alternaria tenuis</i> Nees	0,72	0,53	73,6
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	0,85	0,54	63,5
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	0,54	0,22	40,7

Les différents organismes étudiés ont donc accepté la cyanamide comme seule source d'azote du milieu. Il y a lieu de noter qu'à dose égale d'azote, dans nos conditions d'essais, nous n'avons jamais obtenu sur cyanamide, quel que soit le Champignon mis en culture, un poids de mycélium égal à celui obtenu sur milieu au nitrate d'ammoniaque.

II. — ACTIVITE CYANAMIDASIQUE.

Afin de comparer entre elles, quant à leur activité cyanamidase, les diverses espèces dont nous venons d'étudier le développement, sur milieu à la cyanamide, nous avons été conduits à déterminer leur valeur cyanamidase.

A. — Unité d'activité et valeur cyanamidases.

Tenant compte des résultats obtenus au cours de l'étude des principales caractéristiques de la cyanamidase d'*A. niger* (Ch. IV) nous avons ainsi défini conventionnellement une unité d'activité et une valeur cyanamidases.

L'unité d'activité cyanamidase (U) est la quantité d'enzyme qui mise en présence de 42 mg. de cyanamide libre en solution à pH 7 dans 20 ml. de tampon phosphate disodique-acide citrique de Mac-Ilvaine hydrolyse à 50° et en 25 minutes 25 % de substrat.

La valeur cyanamidase (V) est exprimée par le nombre d'unités cyanamidases contenues dans 100 mg. de mycélium sec.

B. — Valeur cyanamidase des Champignons étudiés.

Pour déterminer cette donnée (V) on porte au bain-marie à 50° des milieux correspondant aux compositions suivantes :

	T	E
Tampon pH = 7	10 ml	10 ml
CN ₂ H ₂ M/10	10 »	10 »
Poudre de mycélium	-	0,2 g.
Poudre de mycélium portée pendant 30 minutes à 100° dans le tampon	0,2 g.	
Toluène (gouttes)	4	4

Après 25 minutes d'action à 50° on détermine l'urée formée sur un prélèvement de 5 ml. Les chiffres réunis dans le tableau ci-dessous ont permis de calculer les valeurs cyanamidases des différents Champignons. La recherche de l'urée et de l'ammoniaque dans les

TABLEAU XXI

CHAMPIGNONS	Poids de dixanthylurée (mg.)	% de substrat hydrolysé	Valeur cyanamidasiq. (V.)
<i>Aspergillus niger</i> E.N.A.R. 152	26,8	25,5	0,510
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrengerb	20,2	19,2	0,384
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	20,2	19,2	0,384
<i>Mucor</i> sp. I	18,3	17,4	0,348
<i>Mucor</i> sp. II	15,4	14,6	0,292
<i>Monilia fructigena</i> Pers.	13,2	12,5	0,250
<i>Aspergillus niger</i> E.N.A.R. 151	30,2	28,7	0,570
<i>Aspergillus tamarii</i> E.N.A.R. 191	21,7	20,6	0,412
<i>Aspergillus repens</i> (Corda) de Bary	25,4	24,1	0,462
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer	18,1	17,2	0,344
<i>Penicillium (glaucum)</i> souche I	24,7	23,5	0,470
<i>Penicillium (glaucum)</i> " II	18,4	17,5	0,350
<i>Citiosporium herbarum</i> Persoon Link, E.N.A.	16,1	15,3	0,306
<i>Citiosporium herbarum</i> Persoon Link Isolé	21,9	20,8	0,416
<i>Alternaria tenuis</i> Nees	19,2	18,2	0,364
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	19,6	18,6	0,372
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	8,3	7,9	0,158

fioules T, restée négative dans tous les cas, permet de conclure qu'il y a bien dégradation enzymatique. Ces résultats confirment ceux qui ont été obtenus précédemment (Ch. III). Les souches de ces Champignons cultivées en l'absence de cyanamide fournissent des mycélium incapables de dégrader cette amide par voie enzymatique. Par contre ces divers organismes peuvent produire, dans certaines conditions de culture, sur cyanamide, un enzyme d'adaptation : la cyanamidase qui leur permet d'utiliser la cyanamide comme seule source d'azote.

III. — CONCLUSIONS.

Différents Champignons inférieurs, appartenant à des groupes systématiques divers et faisant partie de la microflore banale de nombreux sols sont capables d'utiliser pour l'édification de leur mycélium la cyanamide comme seule source d'azote. Cette utilisation est possible grâce à la synthèse en présence du substrat spécifique, d'un enzyme strictement adaptatif : la cyanamidase. La valeur cyanamidase des organismes étudiés est variable. Les *Aspergillus* du groupe *niger* se révèlent un matériel de choix pour l'étude de la cyanamidase; mais d'autres Champignons faciles à obtenir en culture, présentent des valeurs cyanamidasiques élevées, parfois très proches de celles des *Aspergillus*.

CHAPITRE VI

Action de la cyanoguanidine (dimère de la cyanamide) sur quelques Champignons

I. INTRODUCTION.

II. PREPARATION DE LA CYANOGUANIDINE.

III. ESSAIS D'UTILISATION DE LA CYANOGUANIDINE COMME
SEULE SOURCE D'AZOTE.

A — *Aspergillus niger*.

B — Champignons inférieurs divers.

IV. ESSAIS DE TOXICITE.

V. CONCLUSIONS.

Action de la cyanoguanidine (dimère de la cyanamide) sur quelques Champignons

I. — INTRODUCTION.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé à différentes reprises (ch. I, ch. II), la cyanamide en solution aqueuse a la possibilité, selon les conditions de milieu, de fournir différents polymères dont le mieux connu est le dimère d'abord appelé dicyanamide, celui qui a fait l'objet de travaux biologiques et agronomiques. Le terme de dicyan-diamide est généralement utilisé par les auteurs étrangers : les agromomes français utilisent plus fréquemment le terme de dicyanamide, terme qui a été employé également pour désigner la dicyanimide, ce qui le fait rejeter par la plupart des chimistes. La structure du dimère de la cyanamide est toujours contestée, cinq formules de constitution ont été proposées. A l'heure actuelle la formule proposée par BAMBERGER dès 1880 qui correspond à la cyanoguanidine



est la plus généralement admise (6) et actuellement les chimistes français ont tendance, à la suite de Guillaumin (48), à désigner ce dimère sous le nom de cyanoguanidine, désignation que nous avons retenue.

Les propriétés physiologiques de la cyanoguanidine vis-à-vis des végétaux sont encore très discutées. Pendant longtemps les auteurs allemands (IMMENDORF et THIELBEIN (52), etc...) ont attribué les propriétés, néfastes dans certains cas, de la cyanamide calcique à la présence de cyanoguanidine. D'autres auteurs comme LÖWE admettent que la cyanoguanidine n'est pas toxique et ils en concluent que le « groupe toxique — $\text{C}\equiv\text{N}$ » n'existe pas dans sa constitution. En 1909 PEROTTI et ULPANI (107) considèrent que la cyanoguanidine peut servir de source d'azote pour les végétaux supérieurs mais que, ainsi que le constate GUILLIEN (in 46), les Bactéries, dans les conditions habituelles de la nitrification, ne réagissent pas sur ce corps : ils en déduisent que la cyanoguanidine n'est pas « fermentescible ».

Dans la bibliographie concernant la cyanoguanidine on trouve, à différentes époques, des partisans des trois théories : toxicité, indifférence, utilité, vis-à-vis des végétaux supérieurs ou des microorganismes.

En 1919 MAZÉ, VILA, LEMOIGNE (71), expérimentant sur le maïs, sont amenés à considérer la cyanoguanidine comme non toxique et non assimilable. A la même époque COWIE (24) constate que la cyanoguanidine est toxique pour les ferments nitriques, son apport au sol arrêtant l'oxydation de l'ammoniaque. BELING (8) en 1924 ainsi que JACOB, ALLISON et BRAHAM (53) arrivent aux mêmes conclusions : la nitrification est retardée, l'ammonification non influencée. BRIOUX en 1926 (17) conclut à la toxicité de la cyanoguanidine, après essais sur la Montarde blanche et le Sarrasin. A la suite des travaux de cet auteur, elle est considérée comme toxique par beaucoup d'agronomes français actuels (65, 90) ; quelques auteurs comme DEMOLON (28) pensent qu'elle n'est pas toxique mais sans valeur parce que « non nitrifiable ».

Plus récemment GIESECKE et SCHMALFUSS (43), après des essais de longue durée, concluent à une lente disparition de la cyanoguanidine dans le sol, leurs essais sur végétaux supérieurs leur font considérer la « dicyandiamide » comme inutilisable bien qu'elle soit absorbée par ces organismes. NOMMIK (78) incorporant de la cyanoguanidine à des échantillons de sol retrouve après 86 jours d'expérience environ, le tiers de l'azote ainsi incorporé sous formes ammoniacale et nitrique mais à la condition d'enrichir le sol en glucides facilement utilisables par la microflore.

Reprenant comme matériel biologique les Champignons inférieurs utilisés dans l'étude de la cyanamide, nous avons étudié la possibilité de toxicité ou d'utilité de la cyanoguanidine pour ces organismes.

II. — PREPARATION DE LA CYANOGUANIDINE.

Ne disposant pas au début de notre travail de cyanoguanidine du commerce nous avons été amené à préparer ce corps. Après divers essais, la technique suivante a été retenue.

100 g. de cyanamide calcique en poudre sont délayés dans 500 ml. d'eau distillée à la température du laboratoire. Après deux minutes d'agitation on filtre sur papier pour éliminer toutes les parties solides. Le filtrat recueilli dans une fiole conique est aussitôt refroidi en maintenant la fiole dans la glace fondante. A basse température on fait barboter dans ce filtrat du gaz carbonique : la chaux de la cyana-

mide calcique et la chaux libre sont précipitées à l'état de carbonate que l'on sépare par filtration. La solution de cyanamide libre ainsi obtenue est portée lentement à l'ébullition et concentrée au dixième du volume primitif : au cours du refroidissement la cyanoguanidine précipite. Le produit est ensuite purifié par plusieurs dissolutions, filtrations et cristallisations successives. On obtient finalement de belles aiguilles monocliniques.

III. — ESSAIS D'UTILISATION DE LA CYANOGUANIDINE COMME SEULE SOURCE D'AZOTE.

Les essais ont été effectués en utilisant, comme dans le cas de la cyanamide, le milieu de Bertrand sans azote, auquel on ajoute de la cyanoguanidine à doses diverses. Il faut signaler ici, que dans de tels essais les solutions de cyanoguanidine ne doivent pas être stérilisées à l'autoclave. Nous avons pu constater qu'après 20 minutes à 120° on trouvait 12 % de l'azote de la cyanoguanidine du milieu de culture à l'état d'ammoniaque.

La guanylurée, qui donne en milieu ammoniacal-sodique, avec le nitrate de nickel en présence de mannitol, un précipité jaune brun caractéristique (3) (48), peut être mise en évidence après stérilisation à l'autoclave d'un milieu de culture renfermant de la cyanoguanidine : la guanylurée est facilement utilisable comme seule source d'azote par les Champignons étudiés.

A. *Aspergillus niger*.

Les essais ont été effectués en ballons de 1 litre avec 200 ml. de milieu de culture, mis à l'étuve à 34°. Les doses de cyanoguanidine ont été respectivement en azote de 1/10, 1/5, 1/2, 1/1 de la dose normale d'azote du milieu de Bertrand (1,17 g. par litre). Pour toutes ces doses aucun développement du mycélium n'a été constaté après 36 heures et même après 8 jours de culture.

Par contre, si l'on maintient trois mois à l'étuve le milieu semencé, en apportant tous les 10 jours un peu d'eau distillée pour compenser les pertes par évaporation, on constate qu'un mycélium peu épais se développe et que les conidies se forment. Ce mycélium desséché sous vide et broyé n'a aucune action sur les solutions de cyanoguanidine.

Les essais ont été effectués aux pH 5, 6, 7 et 8 avec le tampon phosphate disodique-acide citrique, aux températures de 25°, 35°, 45°

et avec des milieux de concentration en cyanoguanidine de M/10, M/100, M/1000. Après 2, 6 et 24 heures d'action il n'a pas été possible de mettre en évidence l'existence de :

la cyanamide (absence de précipité jaune avec le nitrate d'argent ammoniacal).

la guanylurée (absence de précipité avec les sels de nickel).

l'urée (pas de précipité par le xanthidrol en milieu acétique).

l'ammoniaque (réaction négative au réactif de Nessler).

Il y a lieu d'attribuer la possibilité de développement du mycélium, développement lent et très irrégulier, à la dégradation lente de la cyanoguanidine dans le milieu de culture, en produits pouvant assurer la croissance du Champignon par fourniture d'un minimum d'azote sous forme utilisable.

Des essais d'ensemencement de milieux de culture contenant comme seule source d'azote de la cyanoguanidine avec des conidies provenant de mycélium obtenus après plusieurs mois dans les conditions indiquées ci-dessus, n'ont fourni aucun développement rapide et normal du champignon et aucune différence de comportement par rapport à des conidies obtenues sur milieu à l'extrait de malt utilisées comme témoin. Il ne semble donc pas qu'il y ait eu, dans ces conditions expérimentales, d'adaptation du microorganisme à la possibilité d'utilisation de la cyanoguanidine.

Des adjonctions aux milieux de culture à doses diverses en cyanoguanidine de complexe vitaminique B, sous forme d'extrait de levure, et d'acides aminés, sous forme de peptones et d'hydrolysats de caséine, n'ont pas modifié les propriétés physiologiques du Champignon vis-à-vis de la cyanoguanidine. On obtient dans ces cas de minces mycélium qui ont utilisé la faible dose d'azote apportée par les compléments, ces mycélium n'ont montré aucune possibilité de dégradation de la cyanoguanidine.

B. — Champignons inférieurs divers.

Les essais ont été effectués en fiole de Roux, la cyanoguanidine étant ajoutée aseptiquement au milieu après filtration des solutions à la bougie Chamberland.

Les concentrations des milieux en cyanoguanidine correspondaient en azote au 1/5 et au 1/2 de la dose normale.

Nous n'avons obtenu, dans ces conditions (foies maintenues 15 jours à l'étuve à 34°) aucun développement des espèces suivantes :

Rhizopus nigricans Ehrenberg.

Aspergillus niger E.N.A.R. 151.

Aspergillus repens (Corda) de Bary.

Pénicillium (glaucum) I.

Cladosporium herbarum (Persoon) Link I.N.A.

Fusarium graminearum (Schwabe).

On peut donc conclure que, dans ces conditions expérimentales, la cyanoguanidine n'a jamais pu être utilisée comme source d'azote par les Champignons étudiés.

IV. — ESSAIS DE TOXICITE.

Les essais ont été effectués en cultivant l'*A. niger* sur milieu de Czapek contenant comme source d'azote 2 g. de NO_3Na par litre auquel on ajoutait des doses diverses de cyanoguanidine. Les doses ont correspondu à des concentrations en azote égales à 1, 2, 5 et 10 fois celle fournie par le nitrate de sodium du milieu. Après 36 heures de culture les mycélium sont récoltés, rincés, essorés, séchés et pesés. Les essais effectués en ballons sur 400 ml. de milieu ont fourni les résultats suivants :

	Poids en grammes du mycélium sec
Milieu de Czapek	2,72
+ dose 1 de $\text{C}_2\text{N}_4\text{H}_4$	2,71
+ dose 2 »	2,69
+ dose 5 »	2,65
+ dose 10 »	2,74

Dans ces conditions la cyanoguanidine n'a donc montré aucune action toxique vis-à-vis de la souche d'*A. niger* utilisée ; elle n'a freiné en rien sa croissance.

V. — CONCLUSIONS.

Vis-à-vis des Champignons étudiés la cyanoguanidine s'est comportée comme un corps indifférent, ne pouvant être utilisé comme source d'azote mais sans toxicité.

CHAPITRE VII

Conclusions Générales

II. — Recherche de la cyanamidase chez différents végétaux	30
A. Champignons inférieurs.	
a) Provenance	
— Mycothèques	30
— Isolements	31
b) Culture avec différentes sources d'azote autres que la cyanamide	32
c) Protocole expérimental	32
d) Résultats et conclusions	32
B. Phanérogames.	
a) Provenance et préparation des organes végétaux	34
b) Protocole expérimental	35
c) Résultats	35
III. Cyanamidase et uréase	40
IV. — Conclusions	43

CHAPITRE IV

CARACTERES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CYANAMIDE PAR <i>ASPERGILLUS NIGER</i> VAN TIEGH. ET FACTEURS CONDITIONNANT L'ACTIVITE DE L'ENZYME	45
I. — Obtention du matériel enzymatique	47
II. — Action de quelques conditions de culture sur la croissance et la teneur en cyanamidase du mycelium.	
A. Teneur en cyanamide du milieu de culture	47
B. Apports d'éléments complémentaires au milieu culture	
1) Complexe vitaminique B	48
2) Acides aminés	49
III. — Mesure de l'activité cyanamidasique	50
IV. — Détermination du pH optimum d'action	50
V. Influence de la température	53
VI. — Influence de la concentration en substrat	54
VII. — Influence de la concentration en catalyseur	56
VIII. — Marche du processus enzymatique en fonction du temps	59
IX. Action des effecteurs	59
A. Cations divalents	59
B. Acide ascorbique	61
C. Tryptase	62
D. Acide cyanhydrique	62
E. Quinone	63
F. Quinone + Glutathion	64
X. — Conclusions	65

CHAPITRE V

PROPRIETES CYANAMIDASQUES DE QUELQUES CHAMPI- GNONS INFERIEURS	67
I. — Croissance de divers Champignons en présence de cyanamide comme seule source d'azote	69
II. Activité cyanamidasique	71
A. Unité d'activité et valeur cyanamidasique	71
B. Valeur cyanamidasique des Champignons étudiés	71
III. Conclusions	73

CHAPITRE VI

ACTION DE LA CYANOGUANIDINE (DIMERE DE LA CYANAMI- DÉ) SUR QUELQUES CHAMPIGNONS	75
I. — Introduction	77
II. — Préparation de la Cyanoguanidine	78
III. — Essais d'utilisation de la cyanoguanidine comme seule source d'azote	79
A. <i>Aspergillus niger</i>	79
B. Champignons inférieurs divers	80
IV. Essais de toxicité	81
V. — Conclusions	81

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS GENERALES	83
 BIBLIOGRAPHIE	 87

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LES TRICHOMYCETES

Vu et approuvé :

Nancy, le 28 octobre 1959

Le DOYEN
de la Faculté des Sciences

E. URION.

Vu et permis d'imprimer,

Nancy, le 29 octobre 1959,

Le RECTEUR
de l'Académie de Nancy

Gilbert MAYER.

**IMPRI
MERIE
LEMOY**

32^{me} Pl. des Vosges
NANCY - Tél. 57.83.36

**IMPRI
MERIE
LEMOY**
32¹¹¹, Pl. des Vosges
NANCY - Tél 57 83 36